

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Mecánica de membranas basadas en esfingolípidos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elisa Ramírez Catapano

Directores

Iván López Montero
Francisco Monroy Muñoz

Madrid, 2014

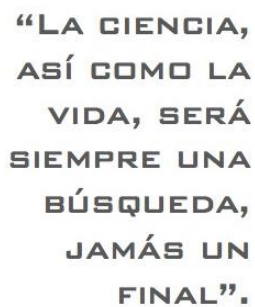
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid

MECÁNICA DE MEMBRANAS BASADAS EN
ESFINGOLÍPIDOS

Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias
presentada por ELISA RAMÍREZ CATAPANO
dirigida por IVAN LÓPEZ MONTERO y FRANCISCO MONROY
MUÑOZ



Octubre 2014



RESUMEN

Título: Mecánica de membranas basadas en esfingolípidos

Introducción

Las ceramidas pertenecen a la familia de esfingolípidos ⁽¹⁾. Durante años, se asumió que el papel de las ceramidas en las membranas biológicas era el de promover fuertes interacciones intermoleculares debido a su capacidad para formar puentes de hidrogeno entre cabeza-cabeza ⁽²⁾. Como consecuencia, tienden a segregarse y formar dominios ordenados que presentan carácter solido o similar al de un gel ⁽³⁾. In vivo, la ceramida puede aparecer en la membrana plasmática como producto de la hidrólisis de la esfingomielina, durante la apoptosis natural o cuando la muerte celular es inducida a través de algún stress celular ^(4,5).

Las ceramidas no forman bicapas estables por sí solas, son desfavorecidas debido a su forma molecular (cono invertido) y sólo ganan suficiente estabilidad cuando son mezcladas con otros lípidos compatibles en la formación de bicapas, particularmente la esfingomielina. Las monocapas de Langmuir de ceramidas son por tanto útiles para entender las propiedades mecánicas de las ceramidas de membrana y su mezclas con lípidos que incluyan esfingomielina.

¹ Goñi, F. M.; Alonso, A. Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1758, 1902–21.

² Pascher, I. Molecular arrangements in sphingolipids. Con- formation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 455, 433–51.

³ Staneva, G., A. Momchilova, ., K. Koumanov. 2009. Membrane microdomains: role of ceramides in the maintenance of their structure and functions. *Biochim. Biophys. Acta*. 1788:666–675.

⁴ Grassmé, H., A. Jekle, ., E. Gulbins. 2001. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 276:20589–20596.

⁵ Grassmé H., V. Jendrossek, ., E. Gulbins. 2003. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* 9:322–330.

Los estudios en monocapas de ceramidas puras son relativamente escasos y se concentran principalmente en las propiedades de equilibrio obtenidas de las isothermas de compresión ^(6, 7, 8, 9, 10, 11). De esos estudios sabemos que las monocapas de ceramidas poseen muy baja compresibilidad en comparación con los típicos fosfolípidos fluidos. En un artículo reciente, se ha demostrado la gran diferencia de propiedades de flujo en cizallamiento entre capas de ceramidas y las típicas membranas fluidas ⁽¹²⁾.

La fluidez, entendida como el inverso de la viscosidad, es uno de los principales atributos de las membranas biológicas, esencial para el mantenimiento de una distribución apropiada de lípidos y una difusión adecuada de las proteínas de membrana en la bicapa; dos aspectos moleculares fundamentales para el funcionamiento de la membrana celular. La información acumulada sobre la estructura ⁽¹³⁾ y las propiedades reológicas de capas monomoleculares ⁽¹⁴⁾ han contribuido crucialmente a la creación de la imagen moderna de las membranas biológicas, como sistemas complejos que no solo son capaces de desarrollar flujo viscoso bajo el movimiento de proteínas

⁶ Carrer, D. C., and B. Maggio. 1999. Phase behavior and molecular interactions in mixtures of ceramide with dipalmitoylphosphatidylcholine. *J. Lipid Res.* 40:1978–1989.

⁷ Carrer, D. C., and B. Maggio. 2001. Transduction to self-assembly of molecular geometry and local interactions in mixtures of ceramides and ganglioside GM1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1514:87–99.

⁸ Maggio, B. 2004. Favorable and unfavorable lateral interactions of ceramide, neutral glycosphingolipids and gangliosides in mixed monolayers. *Chem. Phys. Lipids.* 132:209–224.

⁹ Holopainen, J. M., H. L. Brockman, J. P. K. Kinnunen. 2001. Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine: impact of the N-acyl chain. *Biophys. J.* 80:765–775.

¹⁰ Busto, J. V., M. L. Fanani, J. A. Alonso. 2009. Coexistence of immiscible mixtures of palmitoylsphingomyelin and palmitoylceramide in monolayers and bilayers. *Biophys. J.* 97:2717–2726.

¹¹ Fanani, M. L., and B. Maggio. 2010. Phase state and surface topography of palmitoyl-ceramide monolayers. *Chem. Phys. Lipids.* 163:594–600.

¹² Espinosa, G., I. López-Montero, J. D. Langevin. 2011. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:6008–6013.

¹³ Möhwald, H. 1990. Phospholipid and phospholipid-protein monolayers at the air/water interface. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41:441–476.

¹⁴ Krägel, J., G. Kretschmar, J. H. Möhwald. 1996. Surface rheology of monolayers. *Thin Solid Films.* 284–285:361–364.

(¹⁵), sino también lo suficientemente rígidas para proporcionar una adecuada resiliencia mecánica contra los esfuerzos externos, contribuyendo así con la estabilidad mecánica de la membrana.

Objetivos y Resultados

The most widely accepted proposal for ceramide role in cellular processes is the formation of large platforms. These platforms would be responsible for the spatial and temporal reorganization of receptors and signaling molecules at the cell surface, facilitating signal transmission. To trigger an efficient signal, receptor and downstream proteins need to concentrate in small membrane area. Ceramide-rich membrane domains are believed to have three main roles in signal transduction (¹⁶): (i) aid receptor clustering; (ii) recruit transducing molecules that interact with the receptor activated while excluding other molecules that interfere with the active pathway; and (iii) stabilize the large signaling complexes.

As we have already mentioned, ceramide bilayers present much higher shear elasticity compared to the one found in membranes of different compositions. **De acuerdo con experimentos recientes, nos hemos planteado la hipótesis de que los dominios presentan un rol mecánico importante en la agrupación y posterior inmovilización de los receptores de membrana que actúan en la señalización celular** (¹⁷). The described aggregation of membrane proteins into ceramide domains could also be a consequence to the peculiar ceramide domains shear viscoelasticity. Therefore, ceramide domains could be particularly efficient in concentrating the signal receptors due to their exceptional shear viscoelastic properties.

Esta tesis explora las propiedades viscoelásticas de monocapas de ceramidas que contienen esfingomielina, su precursor metabólico. Para ello, se ha realizado un estudio reológico extenso (compresión y cizalla) con los objetivos siguientes:

¹⁵ Sprong, H., P. van der Sluijs, and G. van Meer. 2001. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504-513

¹⁶ Stancevic B, Kolesnick R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Lett* 2010;584:1728-40.

¹⁷ Espinosa, G., I. López-Montero, ., D. Langevin. 2011. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:6008-6013.

- a) clasificar las diferentes fases termodinámicas encontradas para las ceramidas mediante parámetros mecánicos.
- b) comparar las propiedades mecánicas de membrans formadas a partir de mezclas de esfingomielina/ceramida con las propiedades mecánicas de ceramidas.
- c) probar que las membranas ricas en ceramidas son capaces de arrestar el movimiento de objetos embebidos en ellas.

Del estudio realizado, se obtuvieron valores altos del módulo de compresión y cizalla de monocapas de ceramida a temperatura ambiente, una muestra clara de su comportamiento sólido. A deformaciones mayores de uno por mil, las monocapas de ceramida muestran características plásticas, caracterizadas por una disminución del módulo de almacenamiento seguido de un régimen viscoso típico de lípidos fluidos. Este comportamiento es acompañado por una marcada disminución del módulo de pérdidas a medida que incrementa el esfuerzo, después de haber pasado el límite de elasticidad. Los resultados permiten clasificar inequívocamente a las monocapas de ceramida como sólidos 2D capaces de sufrir deformaciones plásticas, a diferencia de los típicas monocapas de lípidos fluidos.

También se realizaron experimentos reológicos de cizalla de monocapas de ceramida a diferentes temperaturas. Mediante la medida experimental de los parámetros mecánicos y un estudio de isothermas e isobaras se pudo asignar a cada fase su comportamiento mecánico.

Para la esfingomielina se observó un comportamiento reológico correspondiente al comportamiento de un fluido. La incorporación de ceramidas en monocapas de esfingomielina hizo aumentar de manera dependiente con la concentración de ceramida los módulos elásticos de compresión y cizalla de SM. A bajas concentraciones de ceramida, la monocapa se comporta como un gel viscoso, a partir de ($X_{cer} > 66\%$) las monocapas se comportan como un sólido.

Además se realizaron experimentos de “particle tracking” en las monocapas de lípido, para medir las movilidades laterales y se

observó que presentan una correlación con la viscosidad de las monocapas a través de las relaciones usuales de hidrodinámica. En conclusión, la ceramida incrementa el carácter sólido y disminuye la fluidez de las membranas compuestas de esfingomielina, disminuyendo así drásticamente la movilidad que tiene los objetos incrustados en la misma.

Conclusiones

De manera esquemática podemos concluir que:

- Las monocapas de ceramida son sólidas y plásticas.
- Las monocapas de ceramida tienen transiciones termomecánicas a temperaturas fisiológicas.
- Las ceramidas rigidifican las membranas compuestas por esfingomielina.
- La movilidad de objetos embebidos en membranas de esfingomielina se ve reducida por la presencia de ceramida.

A partir de los resultados presentados en esta tesis, se puede concebir fácilmente la capacidad de inmovilización de las plataformas de ceramida, con los dominios de carácter sólido trabajando como elementos secuestradores de las proteínas de señalización. La difusión de proteínas dentro de un dominio rico en ceramida sería extremadamente ralentizado y las proteínas de señalización quedarían congeladas (capping) dentro de los dominios. Por lo tanto, podemos concluir que las ceramidas podrían tener un papel mecánico en la fisiología de la membrana.

ABSTRACT

Title: Mechanics of sphingolipid-based membranes

Introduction

Ceramides belong to the family of sphingolipids (1). For years, it was assumed that the role of ceramides in biological membranes was to promote strong intermolecular interactions due to their ability to form head-to-head hydrogen bonds (2). As a consequence, ceramides in lipid membranes frequently segregate into ordered domains with gel- or solid-like character (3). In vivo, during natural apoptosis or when cell death is induced under stress, infection, or γ -irradiation, ceramide appears in the plasma membrane as a product of sphingomyelin hydrolysis (4, 5).

Due to its unfavorable molecular shape (inverted cone), ceramides do not form stable bilayers alone, only gaining sufficient stability when mixed with compatible bilayer-forming lipids, particularly sphingomyelin. Langmuir monolayers of single ceramides could provide useful information to help us understand the mechanical properties of membrane ceramides in lipid mixtures including sphingomyelin.

Studies on pure ceramide monolayers are relatively scarce and mainly focus on the equilibrium properties obtained from the compression isotherms (6, 7, 8, 9, 10, 11). From those studies, ceramide monolayers are known to possess very low compressibility compared to typical fluid phospholipids. In a recent article, we demonstrated the strong differences in the shear flow properties between ceramide layers and typical fluid membranes (12).

Fluidity, understood as inverse viscosity, is one of the principal attributes of biological membranes essential for maintaining a proper lipid distribution and an adequate diffusivity of the membrane proteins in the lipid bilayer – two molecular aspects key for membrane function. The information accumulated on the structure (13) and rheological properties of monomolecular layers (14) has crucially contributed to the creation of the modern picture

of biological membranes as complex systems that are not only able to develop viscous flow under protein motion (15), but also rigid enough to endow sufficient mechanical resilience to support mechanical stability under external stress.

Objectives and results

The most widely accepted proposal for ceramide role in cellular processes is the formation of large platforms. These platforms would be responsible for the spatial and temporal reorganization of receptors and signaling molecules at the cell surface, facilitating signal transmission. To trigger an efficient signal, receptor and downstream proteins need to concentrate in small membrane area. Ceramide-rich membrane domains are believed to have three main roles in signal transduction (16): (i) aid receptor clustering; (ii) recruit transducing molecules that interact with the receptor activated while excluding other molecules that interfere with the active pathway; and (iii) stabilize the large signaling complexes.

As we have already mentioned, ceramide bilayers present much higher shear elasticity compared to the one found in membranes of different compositions. **According to recent experiments, we hypothesize in this thesis that domains could perform a mechanical roll in clustering and immobilization of membrane receptors during cell signalization (17).** The described aggregation of membrane proteins into ceramide domains could also be a consequence to the peculiar ceramide domains shear viscoelasticity. Therefore, ceramide domains could be particularly efficient in concentrating the signal receptors due to their exceptional shear viscoelastic properties.

This thesis explores the viscoelastic properties of ceramide layers containing the metabolic precursor, sphingomyelin. For that an extensive rheological (compression and shear) study has been performed with the main objectives:

- a) To classify the different thermodynamic phases of ceramides by means of mechanical parameters.
- b) To compare the mechanical properties of lipid membranes formed as sphingomyelin/ceramide mixtures to the mechanical properties of ceramide membranes.

- c) To show that ceramide enriched-membranes are able to arrest the movement of membrane-embedded objects.

The compression and shear viscoelasticity of egg-ceramide Langmuir monolayers were investigated using oscillatory surface rheology in the linear regime and beyond. High compression and shear moduli were measured at room temperature, a clear signature for a solid behavior. At deformations larger than one per mill, egg ceramide monolayers display plastic features characterized by a decrease of the storage modulus followed by a viscous regime typical of fluid lipids. This behavior is accompanied by a marked decrease of the loss modulus with increasing stress above a yield point. The results permit to univocally classify ceramide monolayers as 2D solids able to undergo plastic deformations, at the difference of typical fluid lipid monolayers.

Shear rheological experiments at different temperatures were also performed on ceramide monolayers. Each thermodynamic phase could be characterized by experimental mechanical parameters.

A fluid-like rheological behavior was found for sphingomyelin. The addition of ceramide to sphingomyelin monolayers did dependently increased with ceramide concentration the elastic modulus of compression and shear of SM. At low concentrations of ceramide, monolayers behave as a viscous gel, from ($X_{cer} > 66\%$) monolayers behave as a solid material.

Lateral motilities, measured from particle tracking experiments, were correlated with the monolayer viscosities through the usual hydrodynamic relationships. In conclusion, ceramide increases the solid character of sphingomyelin-based membranes and decreases their fluidity, thus drastically decreasing the lateral motilities of embedded objects.

Conclusions

We can conclude that

- Egg ceramide monolayers are solid and plastic.
- Egg ceramide monolayers have thermo-mechanical transitions at physiological temperatures.
- Ceramides rigidify sphingomyelin-based membranes.
- The mobility of membrane embedded objects is decreased by the presence of ceramides in sphingomyelin membranes.

From the results, the immobilization capacity of ceramide platforms can be easily conceived, with the ceramide solid-like domains working as sequestering elements for signaling proteins. Protein diffusion within a ceramide-rich domain would be extremely slowed down and the signaling proteins would be frozen (capping) within the domains. A possible role for ceramide would be related to the entrapment of these proteins to amplify the signal response. Therefore, we conclude that ceramides might have a mechanical role in membrane physiology.

ÍNDICE

RESUMEN.....4

ABSTRACT.....9

INTRODUCCION.....15

1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS DE MEMBRANAS LIPÍDICAS.

1.1 Autoensamblaje

1.2 Polimorfismo y fases lipídicos

1.3 Movimientos moleculares en el seno de una membrana

1.4 Modelos de membrana

2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE MEMBRANAS LIPÍDICAS

2.1 Compresión/estiramiento

2.2 Cizalla

2.3 Curvatura

3. CERAMIDA: UN LÍPIDO CON PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS ÚNICAS

3.1 Lípidos: fosfolípidos y esfingolípidos

3.2 Estructura y síntesis de ceramidas

3.3 Propiedades fisicoquímicas de ceramidas

4 HIPÓTESIS y OBJETIVOS.

4.1 Hipótesis

4.2 Objetivos

II MATERIALES Y MÉTODOS.....43

5 MATERIALES

5.1 Reactivos

5.2 Lípidos

5.3 Micropartículas

6 MÉTODOS

6.1 Isotermas de compresión

6.2 Reología de compresión

6.3. Reología de cizalla

6.4 Microscopía de Ángulo Brewster

6.5 Particle Tracking

6.6 DSC

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....58

7. RESULTADOS

7.1 Reología de compresión de monocapas de ceramidas

7.2 Reología de cizalla de monocapas de ceramidas

7.3. Transiciones termomecánicas de monocapas de ceramidas

7.4 Reología de compresión de monocapas mixtas de ceramidas y esfingomielina

7.5. Reología de cizalla de monocapas mixtas de ceramida y esfingomielina

7.6. Particle tracking y movilidad en monocapas mixtas de ceramida y esfingomielina.

8. DISCUSIÓN

8.3. Implicaciones biológicas.

8.2. Monocapas mixtas de ceramida y esfingomielina

8.1. monocapas de ceramida de huevo

IV CONCLUSIÓN.....117

9 CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA.....xx

Parte I
INTRODUCCIÓN

1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE MEMBRANAS LIPÍDICAS.

Los lípidos son moléculas anfifílicas; que contienen una parte hidrofílica y una parte hidrofóbica, que existen en la naturaleza y que componen las membranas celulares. La parte hidrofóbica está compuesta de cadenas hidrocarbonadas (llamadas alifáticas) de diferente longitud. El grado de insaturación de las cadenas así como su longitud permite clasificar los lípidos. La parte hidrofílica está compuesta por una variedad de estructuras químicas (cabezas polares) que permiten igualmente una clasificación lipídica. Finalmente, la naturaleza química del esqueleto que une la cabeza apolar con las cadenas apolares permite clasificar a los lípidos en dos grandes grupos: Glicerolípidos (esqueleto formado por glicerol) y esfingolípidos (esqueleto formado por esfingosina)

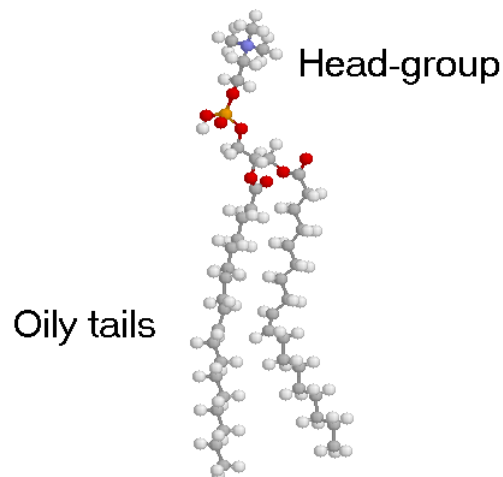


Figure 1.1. Estructura atómica del lípido DOPC (dioleil fosfatidil colina), donde se pueden observar la cabeza polar, el esqueleto de glicerol y las cadenas alifáticas.

1.1 Autoensamblaje

Gracias a su carácter anfifílico, los lípidos tienden a autoensamblarse en diferentes estructuras macromoleculares cuando se disponen en disolución acuosa. La conformación final depende tanto de las características moleculares de los lípidos como del medio acuoso donde están disueltos. Igualmente, las propiedades de polaridad del medio son también importantes.

Cuando una molécula anfifílica (y en particular un lípido) se sumerge en agua, existe una interacción desfavorable sobre la parte hidrofóbica de la molécula. Esta interacción, de carácter entrópico, va a forzar a las moléculas a no exponer sus partes no polares al agua (o por lo menos a minimizar su superficie de contacto) mediante la acción de una “fuerza hidrofóbica” [1,2]. Al mismo tiempo, la parte hidrofílica va a experimentar una interacción favorable con el agua. En presencia de varias moléculas anfifílicas, a partir de una concentración, llamada CMC (concentración micelar crítica), las moléculas se van a organizar en forma de agregados micelares o micelas (Figura 1.2). Esta configuración permite minimizar el contacto de las partes hidrofóbicas con el agua y sólo las partes polares quedan expuestas al agua. La CMC se define por tanto, como la concentración de moléculas anfifílicas a partir de la cual las moléculas se organizan en micelas. Puede ser entendido como una concentración monomérica. Cuando la CMC se sobrepasa, la concentración monomérica es constante. Las moléculas más hidrofóbicas poseen una CMC más pequeña. De manera general, para anfifílos con una sola cadena hidrocarbonada, el aumento de la longitud de cadena por un átomo de carbono implica una disminución de la CMC de un factor 2 [1]. Para lípidos, que poseen dos cadenas alifáticas, la CMC es del orden de 10^{-10} M. Por ello, se puede considerar que la concentración monomérica es despreciable en el equilibrio [2]

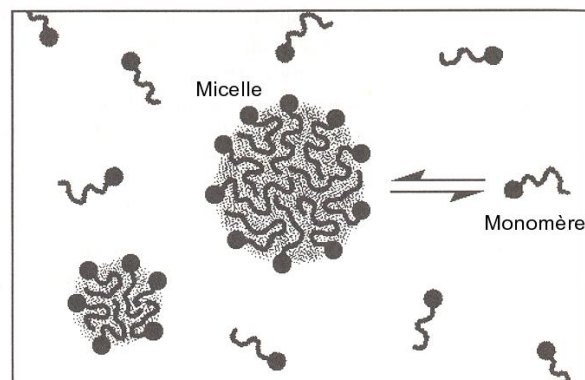


Figura 1.2. Equilibrio entre la forma micelar y monomérica de una molécula anfifílica.

En realidad, no todas las moléculas anfifílicas forman micelas en disolución acuosa. Ciertamente, las moléculas van a formar ensamblados moleculares en razón de las interacciones hidrofóbicas, pero hay varias configuraciones posibles. En base a parámetros moleculares como el volumen de las cadenas, v ; la longitud de las cadenas l_c , y la sección transversal de las cabezas polares a_0 , Israelachvili, desarrolla un modelo sencillo que permite predecir la su conformación en disolución acuosa a partir de un parámetro geométrico de empaquetamiento molecular adimensional que se define como:

$$v/a_0 l_c \quad (\text{Ec. 1.1})$$

y cuyo valor determina el empaquetamiento óptimo que debe tener la estructura del agregado para que éste sea entrópicamente favorable. La figura 1.3 pone de manifiesto los distintas estructuras membranarias en relación con el valor del parámetro de empaquetamiento. Hay que notar que las bicapas están formadas por moléculas que no son capaces de formar micelas. Así, para una misma cabeza polar, el volumen de las cadenas necesario para formar una bicapa debe ser dos veces más grande que para formar una micela. Este hecho, está en concordancia con que la mayor parte de los lípidos, lípidos de una sola cadena, forman micelas, mientras que los lípidos bicatenarios, teniendo la misma cabeza polar, forman bicapas. Esta observación está fuertemente relacionada con la CMC. De manera general, los lípidos de dos cadenas tienen una CMC muy pequeña (10^{-6} - 10^{-10} M) y forman bicapas de manera espontánea, mientras que los lípidos de una cadena tienen una CMC muy grande (10^{-2} - 10^{-5} M) y forman micelas.

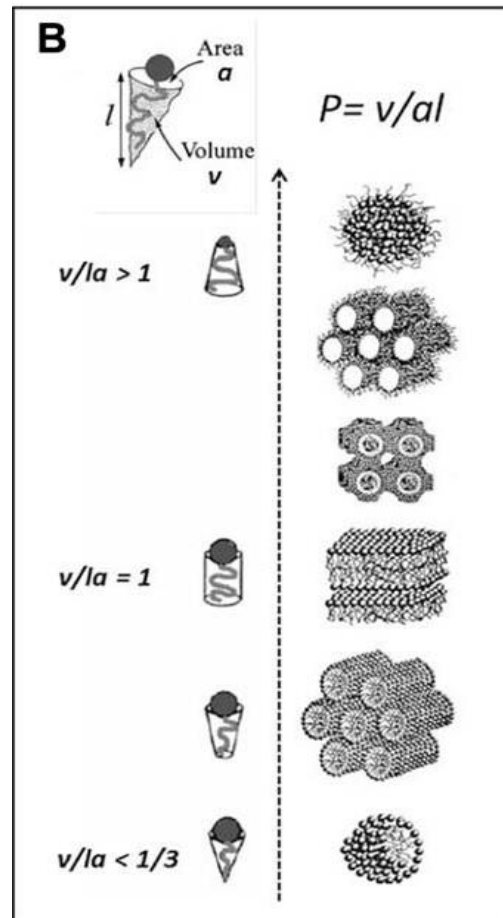


Figura 1.3. Relación entre la forma geométrica molecular de las moléculas anfifílicas y las estructuras membranas formadas mediante autoensamblaje

Un análisis de las geometrías moleculares de los lípidos nos permite clasificar a los lípidos mediante su curvatura espontánea. Así, lípidos con forma cilíndrica ($v/la \sim 1$) y por tanto favorecen geometrías en bicapas planas, tienen una curvatura nula. Lípidos con cabezas polares grandes favorecen curvaturas positivas mientras que aquellos con cadenas hidrocarbonadas voluminosas en comparación con su cabeza polar favorecen curvaturas negativas.

1.2 Polimorfismo lipídico. Fases.

El empaquetamiento geométrico lipídico da lugar a otros tipos de estructuras membranas. El trabajo pionero de Luzzati [3, 4, 5] en

difracción de rayos X de los lípidos en suspensión en agua, reveló la existencia de una amplia variedad de estructuras (polimorfismo de lípidos) con periodicidad en una, dos o tres dimensiones. Cada estructura es una fase que se caracteriza por las propiedades físicas de los componentes moleculares. A pesar de la falta de una clasificación en la nomenclatura universal, podemos hacer una relación las diferentes fases existentes atendiendo a su periodicidad espacial (Figura 1.4). De manera general, las fases se pueden también ordenar en dos grupos principales teniendo en cuenta el contenido de agua y el estado de las cadenas. Hablamos por tanto de fases con propiedades "sólidas" y fases con propiedades "fluidas". Así, las fases fluidas poseen cadenas y lípidos desordenados que tienen una superficie media de 15 a 30% mayor que en la fase "sólida", y la difusión lateral de sus lípidos es mayor (§ 1.3).

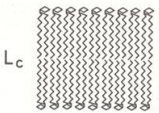
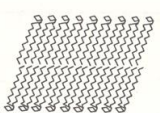
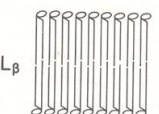

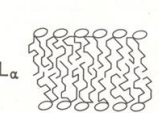

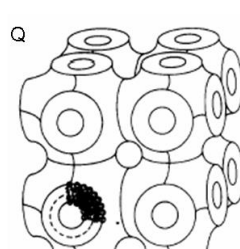
Phases Solides Lamellaires				
Type	Nom	Structure		
3-D	L_c	Cristal 3D		
2-D	L_c^{2D}	Cristal 2D		
	$P_{\beta'}$	Gel ondulé		
	P_{β}	Phase ordonnée		
	B	Phase ordonnée		
1-D	L_{β}	Gel non incliné		
	$L_{\beta'}$	Gel incliné		
	$L_{\beta I}$	Gel interdigité		
	$L_{\alpha\beta}$	Phase entre gel et fluide		
				
Phases Fluides				
Type	Nom	Structure		
1-D	L_{α}	Lamellaire fluide		
2-D	H	Hexagonale		
	H^c	Hexagonale complexe		
	R	Rectangulaire		
	M	Oblique		
3-D	Q	Cubique		
	T	Tétraédrique		
	R	Rhomboédrique		
	O	Orthorhombique		

Figura 1.4. Nomenclatura y representación esquemática de fases lipídicas

Una transición de fase se define como el paso de una fase a otra por un cambio de parámetros termodinámicos, como la temperatura,

El concepto de fluidez membranaria, está asociado por tanto a la capacidad de tránsito molecular dentro de la membrana. Desde un punto de vista biológico, las fases lamelares fluidas son muy importantes. Los organismos vivos intentan mantener este estado fluido en todas sus membranas. Dado que la célula es una estructura dinámica, parece razonable que la célula necesite una membrana, donde el lípido y proteínas pueden moverse libremente en la membrana con el fin de realizar libremente sus funciones, sin ningún tipo de limitación mecánica. Otras fases no lamelares, hexagonales, permiten el desarrollo de ciertos procesos transitorios (tales como fusión de membranas) donde la reorganización de los lípidos es diferente a la de la fase lamelar.

1.3 Movimientos moleculares en el seno de una membrana

Puesto que las propiedades moleculares y termodinámicas definen el estado de los lípidos en los diferentes agregados membranarios, también son responsables de su fluidez y por tanto de la capacidad de albergar en su interior los movimientos moleculares de los propios lípidos así como de inserciones de otras moléculas. Los movimientos moleculares en una membrana lipídica se caracterizan por coeficientes cuyo valor varía dependiendo de la fase en que se encuentre la matriz. Se resumen a continuación los principales movimientos moleculares que pueden darse en una bicapa lipídica así como el valor de los parámetros que los caracterizan en diferentes fases lipídicas; lo que nos permite diferenciar entre fases fluidas y fases ordenadas (Figura 1.6).

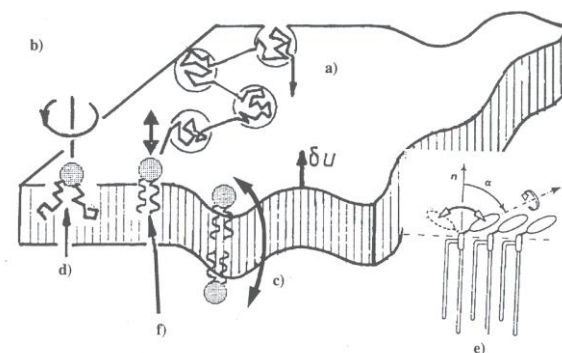


Figura 1.6. Movimientos lipídicos en una membrana. **A)** Difusión lateral, **B)** Difusión rotacional, **C)** flip-flop.

Difusión lateral

La difusión lateral es un movimiento en el plano de la bicapa. La primera medición se realizó por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) utilizando como sonda SL-PC en membranas modelo de lecitinas de huevo [7]. Posteriormente, mediante ESR (Resonancia electrónica de espín) se midió en sistemas modelo [8,9] y en membranas naturales de retículo sarcoplásmico de conejo [10]. El coeficiente de difusión es del orden de $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Este valor significa que un lípido puede cubrir la superficie de un tamaño de celda típica de radio de 10 μm en menos de un minuto. Estas mediciones fueron confirmados por otras técnicas como RMN de protón [11] o FRAP (recuperación de fluorescencia después de fotobleaching) [12]. El valor preciso del coeficiente de difusión lateral depende de la naturaleza del lípido. El coeficiente de difusión lateral disminuye dramáticamente cuando los lípidos están en una fase “sólido” y su valor es $10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ [12]. Por tanto, una primera característica de las fases fluidas es una rápida distribución lateral de los lípidos correspondientes a un intercambio entre dos lípidos vecinos de aproximadamente 1 μs .

Difusión rotacional

Se trata de la rotación del lípido alrededor de su eje longitudinal. Mediante las primeras medidas de tiempo de relajación spin por RMN de protón en bicapas de lecitinas se obtuvo un tiempo típico de $\sim 10^{-8}$ s. Mediante otras técnicas tales como ESR [13] o medidas de tiempo de relajación de espín [14] se han medido valores de 10^{-9} y 10^{-10} s respectivamente. En cuanto a la fase “sólida”, a temperaturas inferiores a la temperatura de transición, se han medido valores mayores del coeficiente de difusión rotacional 10^{-6} s [15].

Difusión transversal o flip flop

El flip-flop, o difusión transversal, de un lípido es el movimiento de rotación de 180 ° a lo largo de un eje perpendicular al plano de la bicapa, es decir, el paso de lípidos de una monocapa a otra en una membrana lamelar. Implica la translocación del grupo polar de cabeza, cruzando la parte hidrofóbica de la bicapa. Este tipo de

movimiento permite la mezcla de los lípidos de las diferentes monocapas de una bicapa. El flip-flop se caracteriza por ser un movimiento muy lento en membranas modelo para lípidos con una parte hidrófila altamente polar como PC, PE, PS, SM o para lípidos cargados negativamente tales como PG o PA. El tiempo característico es de 108 s [16, 17, 18]. La velocidad del movimiento transmembranario depende de la longitud de las cadenas. Cuanto mayores son las cadenas, más lento es el flip-flop [19, 20]. El flip-flop también se ve afectado por las propiedades físicas de la membrana. Como con otros movimientos moleculares, el tiempo característico para un mismo lípido se reduce en fases “sólidas” [21, 22]. Los lípidos neutros con una pequeña cabeza polar como DAG o Cer tienen un movimiento de flip-flop espontáneo más. De esta manera se ha medido un tiempo de 70 ms y 22 minutos para análogos de DAG y Cer respectivamente [18]. Más recientemente se ha medido un tiempo de flip-flop de 1 minuto a 37°C para ceramidas no marcadas [23]

1.4 Modelos de membrana

La disponibilidad de una amplia variedad de membranas modelo resulta muy beneficiosa en la caracterización de componentes de membrana purificados y en el estudio de sus propiedades fisicoquímicas en las distintas escalas espacio-temporales, ya que permite el empleo de muy diversas técnicas experimentales. A continuación se describen algunos de los sistemas modelo de membrana más utilizados, que podemos clasificar en modelos planos (monocapas y bicapas soportadas) y modelos curvos (liposomas, vesículas)

Monocapas

Se denomina tensión superficial de un líquido, γ (mN/m) a la cantidad de energía necesaria para aumentar su superficie por unidad de área. Esta definición implica que el líquido tiene una resistencia para aumentar su superficie. La tensión superficial del agua es alrededor de 73 mN/m a 20°C, que es un valor excepcionalmente alto comparado con otros líquidos. La adición de moléculas anfifílicas sobre una interfase aire-agua reduce la tensión superficial del agua. Las moléculas de una sustancia anfifílica insoluble en agua (Figura 1.7) se extienden y disponen en la

superficie del líquido, generalmente agua, formando una capa molecular o monocapa. La parte hidrofóbica, que suele ser la cadena hidrocarbonada, se orienta hacia el aire, mientras que la parte hidrofílica, que suele ser el grupo polar o con carga, se orienta hacia el agua. Puesto que el grosor de la película es del orden de la longitud de la molécula, se obtiene una película de grosor nanométrico.

Cuando el área disponible para la monocapa es grande, la distancia entre moléculas adyacentes es grande y sus interacciones son débiles. La monocapa puede considerarse como un gas en dos dimensiones. Bajo estas condiciones la monocapa tiene un pequeño efecto en la tensión superficial del agua. Si el área superficial disponible de la monocapa es reducida, las moléculas empiezan a ejercer un efecto repulsión sobre las otras. Este análogo en dos dimensiones de presión es llamado presión superficial, Π , y es dado por la siguiente relación:

$$\Pi = \gamma - \gamma_0 \quad (\text{Ec. 1.2})$$

Donde γ_0 es la tensión superficial en ausencia de monocapa y γ la tensión superficial con la monocapa presente.

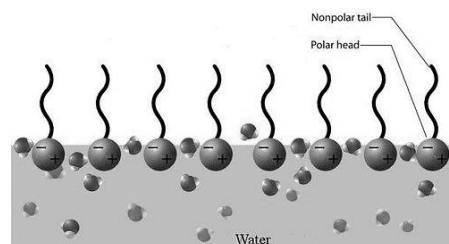


Figura 1.7. Esquema de moléculas surfactantes dispuestas en una interfase aire-agua

Bicapas soportadas

Se trata de un sistema de bicapa lipídica modelo dispuesto en una superficie sólida. Principalmente, su fabricación puede hacerse mediante transferencia de Langmuir-Blodgett; o bien mediante la ruptura y fusión de liposomas lipídicos (ver más abajo) sobre una superficie muy hidrófila, como la mica. El recubrimiento de la superficie del tiempo de incubación, la presencia de iones (tales como Ca^{2+}) y la composición de lípidos.

Vesículas

Las vesículas lipídicas están constituidas por bicapas lipídica que estabilizan sus bordes hidrofóbicos expuestos al agua mediante la formación de una membrana cerrada la cual encierra una cavidad acuosa en su interior. En el proceso de formación de vesículas intervienen dos contribuciones energéticas. Por un lado la energía de la interfaz entre la plataforma y el medio bicapa acuosa. Esta energía tiende a disminuir el área de contacto de la interfaz y por lo tanto para una superficie más favorable forma geométrica dada será un disco de radio. Pero la bicapa no puede crecer infinitamente superficie. Por otro lado, la energía elástica de la curvatura (§ 2.3). El disco se dobla cuando el contacto de energía preferido con los bordes del agua es mayor que la de curvatura. De hecho, la membrana comienza a doblarse con el fin de minimizar el área de contacto en el expensas de un aumento de la energía elástica de la curvatura. Finalmente la membrana toma la forma de una vesícula cerrada [24, 25, 26, 27].

Debido a su similitud con las membranas celulares, las vesículas han sido utilizadas como modelos biológicos. Se clasifican atendiendo a su tamaño y al número de bicapas que componen la vesícula (unilamilaridad). Así, las vesículas pueden estar compuestas por una única o por múltiples lamelas. En el caso de que sea una única bicapa la que separe el interior del disolvente externo, las estructuras se denominan, en función de su tamaño, vesículas unilamelares pequeñas, grandes o gigantes (SUV, LUV o GUV respectivamente) mientras que el término vesículas multilamelares (MLV) se usa en el caso de que sean varias bicapas las que de forma concéntrica atrapen disolvente en los espacios intralamelares.

Las vesículas multilamelares, MLVs, se forman quasi-espontáneamente cuando películas lipídicas secas se hidratan con un exceso de agua o disolución tampón (ver Figura 1.8) [28]. Las vesículas unilamelares pequeñas, SUVs, presentan tamaños comprendidos entre 20 y 100 nm y pueden prepararse mediante diversas técnicas basadas en aportar energía a suspensiones de vesículas multilamelares. Dicha aportación energética puede hacerse mediante sonicación o mediante extrusión [29, 30, 31]. Las vesículas unilamelares grandes, LUVs, presentan tamaños desde 0.1 hasta 1 μm , y pueden prepararse también mediante extrusión,

método de eliminación de disolvente [32], método de inyección [33] y por el método de evaporación de fase reversa [34]. Y por último, las vesículas unilamelares gigantes, GUVs, presentan diámetros de hasta 100 μm . Por tanto, son observables en microscopía óptica. Del mismo modo, pueden ser manipulados usando micropipetas. Por todo ello, son excelentes modelos de membranas biológicas no sólo en tamaño sino también por la posibilidad de hacer con diferentes composiciones, llenarlos con diferentes sustancias y, más recientemente, para insertar proteínas de la membrana en la bicapa mediante diferentes métodos de preparación en los que se incluyen la electroformación [35] y métodos microfluídicos [36].

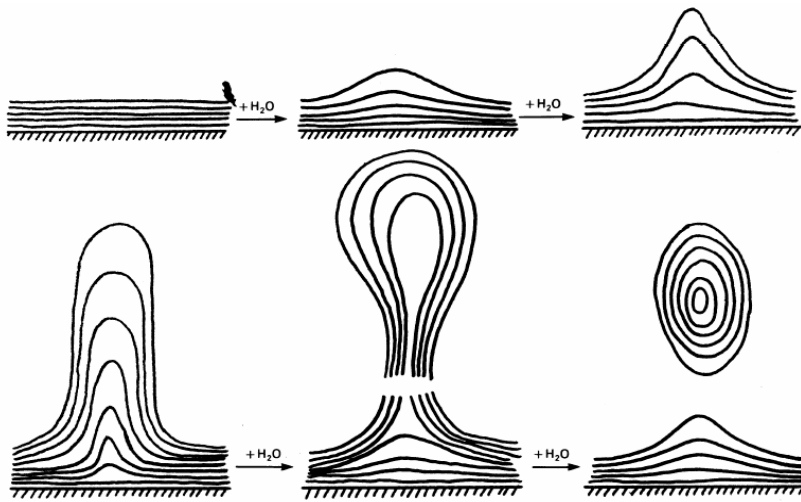


Figura 1.8. Posible mecanismo de formación de MLVs.

2. PROPIEDADES MECÁNICAS DE MEMBRANAS LIPÍDICAS

Como se ha detallado anteriormente, la estabilidad y la conformación de las bicapas lipídicas están controladas por la entropía conformacional del sistema mediante los parámetros de empaquetamiento molecular. De la estructura molecular emergen también propiedades mecánicas de los distintos sistemas membranarios. Las propiedades mecánicas de un material definen su comportamiento ante deformaciones de diferente naturaleza. Por tanto, la composición lipídica define tanto la estructura como el comportamiento mecánico de sistemas membranarios, en particular de sistemas lamelares. Extrapolado a biomembranas reales, se puede afirmar que la célula es capaz de amoldar su composición lipídica en diferentes lugares para regular diferentes procesos que van a estar regidos por las propiedades mecánicas locales de membranas (división celular, dinámica mitocondrial, entre otros).

Los sistemas lipídicos lamelares, por encima de su T_m , pueden considerarse de manera general, sistemas blandos pues es fácil comprimirlos o expandirlos, curvarlos y cizallarlos, dado su carácter fluido.

El espesor de la membrana (~ 5 nm) es tres órdenes de magnitud menor que el tamaño de una membrana típica (desde μm para el caso de liposomas hasta cm en el caso de monocapas y bicapas soportadas). Además consideraremos que las bicapas son simétricas, es decir, que la composición lipídica de las dos monocapas es idéntica. Esto nos permite considerar una bicapa lipídica con espesor despreciable y por tanto considerar la membrana como una sola capa, pudiendo aplicar las definiciones mecánicas de deformaciones elásticas de láminas delgadas. Estas deformaciones llevan asociados tres parámetros o módulos elásticos denominados módulo de compresión E , módulo de curvatura κ_c y módulo de cizalla G , cuyas definiciones se detallan a continuación.

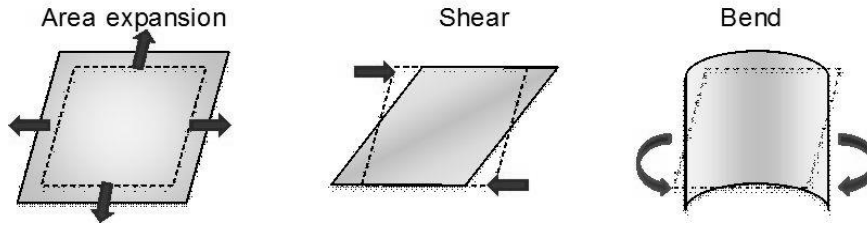


Figura 2.1. Deformaciones elásticas de una membrana. A) Compresión. B) Cizalla. C) Curvatura.

2.1 Elasticidad de compresión

Primero vamos a considerar el hecho de estirar o comprimir la superficie de una membrana a partir de su valor de equilibrio A_0 . La energía de compresión por unidad de área viene dado por la expresión:

$$h_e = \frac{1}{2} K \left(\frac{A - A_0}{A_0} \right)^2 = \frac{1}{2} K \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right)^2 \quad (\text{Ec. 2.1})$$

Donde K es el módulo de compresibilidad lateral (en J/m²) que está relacionado con la energía superficial $K = 4 \gamma$. El orden de magnitud típico de K para una membrana lipídica es de 0,1 J/m² para bicapas deformadas por un solo compuesto lipídico. Así para SOPC, $K = 0,2$ J/m² [37]. La presencia de colesterol en la composición lipídica incrementa el valor de K por una mayor cohesión entre las moléculas [38]. Para SOPC:Chol 1:1 el valor de K es de 1,1 J/m² [37, 39, 40, 41].

La ecuación 2.1 tiene la forma cuadrática típica de procesos elásticos, para deformaciones pequeñas respecto al área de equilibrio. Cuando una membrana se estira, aparece una tensión (σ , en N/m) en toda la superficie que tiende a recuperar el área de equilibrio A_0 . La tensión máxima antes de la ruptura de la membrana (tensión de ruptura, σ_{lyse}) depende principalmente de las interacciones hidrofóbicas, es decir, de la composición lipídica. Los valores medidos varían 0,1 et 0,25 N/m [37, 42, 43, 44, 45, 46]. Sin tener en

cuenta las microrugosidades de una membrana fluctuante [47], la tensión se puede expresar a partir de la densidad de energía:

$$\sigma = \left(\frac{\partial(h_e A_0)}{\partial \Delta A} \right) = K \left(\frac{\Delta A}{A_0} \right) \quad (\text{Ec. 2.2})$$

2.2 Elasticidad de cizalla

Se trata de una deformación a área y curvatura constantes. La membrana se estira en una dirección y se comprime simultáneamente en la otra. La densidad de energía está dada por la siguiente expresión:

$$h_{cis} = \frac{1}{4} G (\lambda^2 + \lambda^{-2} - 2)$$

$$\lambda = \left(\frac{L_0 + \Delta L}{L_0} \right) \quad (\text{Ec. 2.3})$$

donde λ es la variación de elongación lateral y G es el módulo de cizalla (en J/m²). Para las membranas en fase fluida (por debajo de la T_m , $G \approx 0$ [48]. Es decir, las membranas no presentan resistencia a la cizalladura. Solamente por encima de la transición fluido-sólido, el módulo de cizalla toma valores mayores que cero. Como la mayoría de los lípidos presentes en las membranas biológicas presentan una T_m por debajo de la temperatura fisiológica (37°C), se sobreentiende que las membranas celulares son fluidas por definición, permitiendo así el movimiento libre de sus moléculas. Como veremos a lo largo de esta tesis, esto no es así para ciertos lípidos como la ceramida, teniendo importantes consecuencias en su función biológica.

2.3 Elasticidad de curvatura

Esta deformación da cuenta de la variación de energía del sistema cuando éste se curva. La energía superficial de curvatura viene dada por la expresión:

$$h_c = \frac{1}{2} \kappa \left(\frac{1}{R} \right)^2 \quad (\text{Ec. 2.4})$$

Donde κ es el módulo de curvatura o rigidez (en J). En general, el valor numérico de κ para lípidos es de varios 10^{-20} J [49]. Este valor corresponde a $\sim 10 kT$ (con $T = 298$ K), donde k es la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta. kT representa la energía de origen térmico que proviene del movimiento browniano de las moléculas de agua que rodean la membrana. Como κ (el coste energético para doblar una membrana por unidad de superficie) no es demasiado grande en relación a kT , la energía térmica puede provocar ondulaciones en la membrana y cada punto va a oscilar alrededor de una posición media. Por esta razón, las vesículas tienen fluctuaciones térmicas a temperatura ambiente. EL módulo de rigidez es sensible también a las proporción de colesterol en una mezcla lipídica. De manera análoga a E , κ aumenta con mayores proporciones de colesterol [50]. Tanto la longitud de cadena como su grado de insaturación modulan los valores de κ . De manera simplificada, cuanto mayor es la longitud de cadena, mayor es el módulo de curvatura. Sin embargo, el módulo de rigidez disminuye con el grado de insaturación de las cadenas [51].

3. CERAMIDA: UN LÍPIDO CON PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS ÚNICAS

La célula necesita mantener un medio interno apropiado para poder llevar a cabo las reacciones químicas necesarias del mantenimiento de la vida. Esto es posible gracias a que los sistemas vivos, excepto algunos virus, se encuentran separados del medio externo inanimado por membranas celulares que permiten el intercambio selectivo de material. En el caso de células eucariotas, existen membranas internas que limitan compartimentos adicionales donde se realizan funciones altamente específicas, necesarias para la supervivencia celular. Las membranas celulares no son paredes rígidas, sino estructuras complejas y dinámicas compuestas por moléculas que poseen características especiales. Tales características hacen posible la existencia de interacciones específicas entre los sistemas de membrana internos de la célula, y de ésta con el medio que la rodea.

Los principales componentes de las membranas celulares son lípidos y proteínas de membrana. La proporción en peso de estos dos componentes varía de un tipo de célula a otra, pudiendo llegar hasta el 75% de proteína para glóbulos rojos [52]. El primer modelo de membrana plasmática compatible con las propiedades fisicoquímicas de los lípidos, llamado modelo de « *Mosaico Fluido* », fue propuesto por Singer et Nicholson [53]. En efecto, las membranas celulares están formadas en general por fosfolípidos bicatenarios con una o varias insaturaciones. Esto permite el autoensamblaje de los lípidos en forma de bicapas fluidas (en fase L_α) a temperaturas fisiológicas. Una CMC pequeña asegura que los lípidos no estén bajo una forma monomérica.

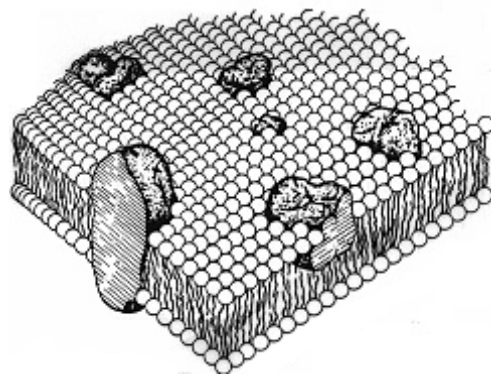


Figura 3.1. Modelo de membrana llamado Mosaico Fluido.

En el modelo de Mosaico Fluido, las moléculas lipídicas formarían un medio donde las proteínas de membrana están insertas. En la figura 3.1, los lípidos forman una bicapa pero sólo tendrían una función estructural, con el único objetivo de estabilizar las partes hidrofóbicas de las proteínas de membrana. Estas últimas difunden libremente en la matriz lipídica. En realidad esta imagen, es una simplificación de la verdadera complejidad de las membranas celulares. Las membranas celulares están en continuo reciclaje y se renuevan por completo en menos de 30 minutos [54, 55, 56]. Además las células están sujetas a numerosas deformaciones mecánicas (ya sea un células tisulares como células independientes) de manera que la composición lipídica de las membranas celulares, tanto a nivel global como local, juega un papel importantísimo para la integridad y funciones celulares. Para ello, la célula poseen un catálogo extenso de especies lipídicas que se clasifican en cuatro grandes grupos: glicerofosfolípidos, esteroides y esfingolípidos.

3.1 Lípidos: fosfolípidos y esfingolípidos

Los lípidos de membrana se clasifican en tres grandes grupos : 1) glicerofosfolípidos, llamados con frecuencia fosfolípidos; 2) esfingolípidos y 3) esteroides e isoprenoides lineales.

Los fosfolípidos se construyen a partir de una molécula de glicerol que se vuelve quiral por la unión de un grupo fosfato. En concreto es el isómero L, denominado sn-glicero-3-fosfato, el que forma parte de las membranas naturales. Cuando la esterificación del glicerol se produce por la unión de dos cadenas de ácido graso en los carbonos 1 y 2, la molécula formada se denomina ácido fosfatídico (PA). La esterificación del PA con otro alcohol da lugar a los siguientes tipos de PLs: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilglicerol (PG), y fosfatidilinositol (PI). Además, PG puede unirse a través del glicerol que actúa como grupo de cabeza a PA, dando lugar a difosfatidilglicerol, comúnmente llamado cardiolipina (CL). Estas abreviaturas se combinan con las correspondientes a las cadenas acílicas, resultando

por ejemplo, DPPC para 1,2-dipalmitoilfosfatidilcolina y POPC para 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina. En muchos PLs de membrana, la cadena acíclica sobre el C1 está saturada y suele tener entre 16 y 18 carbonos mientras que sobre el C2 la cadena suele presentar una insaturación y ser ligeramente más larga. Las estructuras químicas de los PLs se presentan en la figura 3.2:

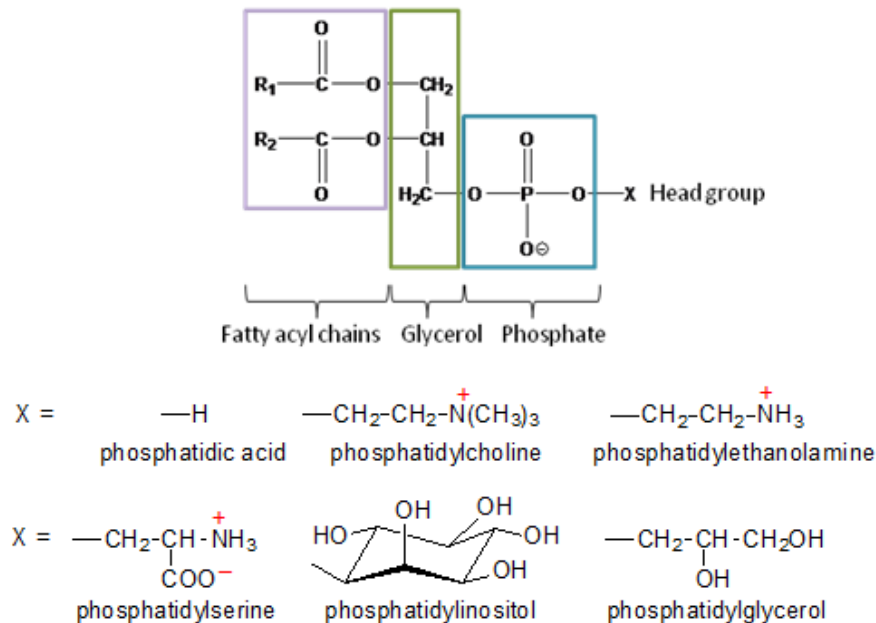


Figura 3.2 Estructura química de los fosfolípidos

Los esfingolípidos, a diferencia de los PLs cuya molécula base es el glicerol, se construyen a partir de una molécula de esfingosina (figura 3.3). Dentro de este grupo los lípidos más comunes son las esfingmielinas (SMs), que son esfingolípidos con cabezas polares PC o PE, de creciente interés por ser junto con el colesterol, los componentes principales de una nueva fase termodinámica llamada líquido ordenado. Otros esfingolípidos, como cerebrósidos y gangliósidos, tienen oligosacáridos como grupo de cabeza. Son los componentes principales de las membranas de las células nerviosas y desempeñan un papel fundamental en el reconocimiento celular y la diferenciación.

Finalmente, la tercera clase de lípidos está formada por compuestos derivados del isopreno. El colesterol es el esteroide predominante en las células animales. Es una molécula que presenta una cola voluminosa

y rígida u un grupo de cabeza pequeño. El colesterol se encuentra sobre todo en células animales a concentraciones que pueden alcanzar el 40% en peso de los lípidos totales [52]. El colesterol posee la propiedad de condensar y ordenar una fase lamelar fluida y por el contrario fluidificar una fase ordenada. La presencia de colesterol en las membranas tiene un efecto sobre sus propiedades estructurales y las propiedades dinámicas de los lípidos: aumenta el espesor de las cadenas hidrocarbonadas y su compresibilidad y produce la disminución de la difusión lateral de los lípidos [57, 58, 59]. En cuanto a la difusión transversal, parece que el colesterol disminuye el tiempo de flip-flop de manera proporcional a su concentración [60].

La introducción de colesterol en una bicapa lipídica constituida por PLs y/o esfingolípidos puede dar lugar a la aparición de una nueva fase lamelar llamada L_o (por *liquid ordered*) [61]. En esta fase los lípidos tienen una mayor rigidez de las cadenas pero mantienen una difusión lateral y rotacional rápidas [62,63]. Las composiciones lipídicas que dan lugar a esta fase hacen intervenir tres tipos de lípido: Uno con una baja T_m (como PC con cadenas insaturadas), otro con T_m grandes (como PCs saturados o SM) y el colesterol. [64, 65, 66, 67]. Por un lado, estos tres lípidos son mayoritarios en la monocapa externa de las células eucariotas. Por otro, se ha encontrado coexistencia de fases L_α - L_o en sistemas *in vitro* compuestos por estos lípidos. A partir de estas observaciones, se ha postulado la existencia de heterogeneidades dentro de la membrana plasmática compuestas por resta fase L_o : es la llamada hipótesis "raft" lipídico [68, 69], que añadiría cierta complejidad al modelo Mosaico Fluido.

3.2 Estructura y síntesis de ceramidas

La ceramida constituye el esqueleto hidrofóbico de todos los esfingolípidos, como por ejemplo el de esfingomielina (SM), los cerebrosidos y los gangliosidos. Su estructura consiste en una cadena alifática de longitudes variable ligada a un grupo amino de una base esfingoide, principalmente esfingosina [70]. Las cadenas alifáticas son en general saturadas o monoinsaturadas y pueden contener un grupo OH unido al C2 o al átomo del carbono terminal (ácidos grasos α - y ω -hidroxi, respectivamente) (Figura 3.3). Entre las

ceramidas, aquellas que contienen cadenas largas (C16-20) y muy largas (C22-24) son las más abundantes en células animales, pero las ceramidas con cadenas más largas (C26-36) también se encuentran en queratinocitos epidérmicos en células germinales masculinas durante su diferenciación y maduración [71]. En general, las ceramidas son muy poco polares y muy hidrofóbicas. En consecuencia, son muy poco solubles en agua y no pueden existir en solución en fluidos biológicos ni en el citosol [72]. Quizás por ello, las ceramidas son el mayor componente del *stratum corneum*, y podría actuar como barrera hidrofóbica de la piel. Las enzimas implicadas en la generación de ceramida se localizan en diferentes compartimentos subcelulares. Varias rutas metabólicas podrían estar involucradas en la generación de ceramida, la mayoría de ellas se activan mediante la respuesta a un estímulo de stress. [73,74,75] (Figura 3.3). La ruta de síntesis *de novo* de ceramida se desarrolla en el retículo endoplasmático mediante la condensación de serina y palmitoato para formar 3-keto-dihidroesfingosina [76,77, 78, 79]. Esta etapa constituye el paso limitante de esta ruta y es catalizada mediante la enzima serina palmitoiltransferasa. El metabolito 3-keto-dihidroesfingosina se reduce a dihidroesfingosina, el cual es acilado a dihidroceramida mediante la ceramida sintetasa. En mamíferos, se han identificado seis isomorfos de la ceramida sintetasa, cada uno de ellos con una alta especificidad por las acylCoA con diferentes longitudes de cadena, y por lo tanto sintetizando (dihidro) ceramidas de distinta longitud de cadena [80]. La dihidroceramida se convierte ulteriormente en ceramidas mediante la proteína dihidroceramida desaturasa. La ceramida se transporta entonces hacia el Golgi mediante tráfico vesicular o bien mediante proteínas de transporte CERT [81,82]. Una vez en el aparato de Golgi, la ceramida puede ser metabolizada en otros esfingolípidos.

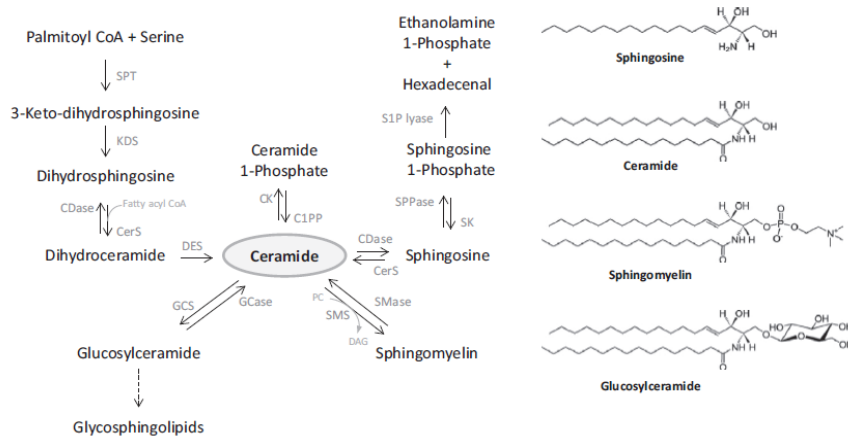


Figura 3.3. Estructura y metabolismo de ceramidas y esfingolípidos

Además de la ruta de síntesis *de novo*, la ceramida puede ser generada en la membrana plasmática a través de la activación de la enzima esfingomielinasa (SMase), que hidroliza SM en ceramida [79, 83, 84]. Las células poseen varios isoformas de SMase, que se diferencian por su pH óptimo de actividad, por su dependencia iónica y su localización subcelular. According to these features they have been classified into acid, neutral and alkaline SMases [74, 85]. For several years, acid and neutral SMases were believed to be the only isoforms involved in cell signaling, although recent reports have proposed potential signaling roles for alkaline SMases [86]. Ambas rutas metabólicas de la generación de ceramida mediante las SMases, ácida y neutra, se activan en respuesta a estímulos celulares por una gran variedad de citoquinas, agentes de diferenciación o moléculas anticancerígenas [78, 87, 88], desencadenando una rápida formación de ceramida en la membrana plasmática. Esta repentina formación de ceramida se encontró en la superficie de las células T y B mediante la activación de receptores de la familia TNF (Tumor necrosis factor). En esta ruta, la ceramida se forma dentro de dominios lipídicos, facilitando así, la agrupación y empaquetamiento de estos receptores [89, 90, 91, 92].

La ceramida también se puede generar mediante la descomposición de esfingolípidos complejos mediante la acción de hidrolasas específicas, provocando la formación de glucosilceramida y galactosilceramida. Análogamente, b-glucosidasas y galactosidasas específicas hidrolizan estos lípidos para generar ceramida [79, 85]. Recientemente, se han identificado nuevos mecanismos de acumulación de ceramida mediante catabolismo de esfingolípidos

complejos, que son descompuestos a esfingosina para su reutilización para producir ceramida a través de un proceso de reacilación, implicando la acción de varias enzimas localizadas en los endosomas tardíos o en los lisosomas. [93].

3.3 Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades termotrópicas y de fases de las ceramidas son complejas y dependen del grado de hidratación. En general, las ceramidas poseen una temperatura de transición líquido-“sólido” muy alta, muy por encima de la temperatura fisiológica. Shah et al. [94] estudiaron en profundidad el comportamiento de fases de la ceramida sintética C16 en función del contenido de agua. Estos autores observaron que la C16-Cer tenía una transición endotérmica ancha en torno a 95.4 °C, medida mediante calorimetría diferencial (DSC, ver § 6.5), correspondiente a una transición que pasa entre una fase gel ordenada caracterizada por un empaquetamiento cristalino de las cadenas a una fase desordenada. Sin embargo, mediante hidratación, el comportamiento se vuelve más complejo: apareciendo una transición exotérmica ancha en torno a 50–70 °C y la transición principal endotérmica bajaba a 90 °C. Además, el comportamiento polimórfico observado depende del tiempo de la temperatura de incubación, lo que sugiere una posible transición de una fase metaestable a una fase estable. Los estudios de difracción de rayos X ponen de manifiesto además que la transición exotérmica corresponde a una transición de una bicapa metaestable en forma gel a una bicapa estable gel con un empaquetamiento ordenado de sus cadenas. Más recientemente, se han estudiado propiedades termotrópicas de ceramidas con cadenas muy largas y asimétricas C24:1-Cer [95]. Esta ceramida presenta también un comportamiento termotrópico complejo, con una transición de una fase gel interdigitada mixta a una fase gel parcialmente interdigitada a ~20 °C, y una transición principal ancha a una fase fluida a ~52 °C. Además, estudios de DSC revelan una pequeña transición endotérmica a más altas temperaturas que podrían estar asociadas a transiciones a fases no lamelares. Experimentos de rayos X confirman la capacidad de la C24:1-Cer para formar fases gel interdigitadas, con un empaquetamiento hexagonal en un rango amplio de temperaturas. Recientemente, se han comparado el comportamiento termotrópico de ceramidas con distintas

estructuras de cadenas alifáticas [96]. Y se ha observado que el aumento de la longitud de las cadenas de ceramidas saturadas, desde C16 a C24, no cambia significativamente la temperatura de transición, T_m , la cual está establecida en torno a $\sim 92-93$ °C. Para C24:1-Cer, se ha observado una menor T_m de ~ 74 °C debido a la presencia de una insaturación en una de sus cadenas. Esta T_m , es sin embargo, significativamente mayor comparado con la encontrada por otros autores [95]. Estas diferencias encontradas podrían estar debidas a las distintas maneras de preparación de las muestras empeladas en estos dos trabajos, y en particular a la historia térmica de las muestras, la cual ha sido demostrado que cambian el comportamiento termotrópico de las ceramidas [94]. También se han caracterizado el empaquetamiento de ceramidas de diferentes cadenas en monocapas [97,98]. Se ha demostrado que la ceramida de cerebro tipo III, que consiste en una mezcla de ceramidas con diferentes cadenas hidrocarbonadas, forma un líquido condensado a 24 °C con un área por molécula de 0.40 nm² y un potencial de superficie de 515 mV en la presión de colapso de 40 mN/m [97,98]. Las ceramidas sintéticas con una estructura de cadena bien definida, y con longitud de cadenas más cortas que la cadena hidrocarbonada de la esfingosina, pueden formar fases expandidas que tienen una transición típica de líquido expandido a fase condensada a presiones laterales definidas a temperatura ambiente. [99]. Además, esta presión depende fuertemente de la longitud de la cadena alifática [100]. Incluso, se ha observado que la ceramida C16 tiene un comportamiento de fases muy rico, coexistiendo fases sólidas, líquido condensado y líquido expandida en un amplio rango de temperaturas [101], lo que evidencia las propiedades polimórficas de esta ceramida.

La ceramidas naturales de cadena larga se caracteriza por su comportamiento anfifílico insoluble. Sin embargo, las ceramidas de cadenas cortas de menos de 10 átomos de carbonose comportan como moléculas anfifílicas solubles en agua con una CMC comprendida en un rango de 5– 6 μM [102]. Además, estas ceramidas forman agregados u precipitan cuando su concentración por encima de 100 μM [102]. Por la tanto, el uso de ceramidas cortas en experimentos biológicos deberían interpretarse con mucha cautela pues sus propiedades biofísicas difieren enormemente de las ceramidas fisiológicas largas, y tendrán un impacto fisiológico muy diferente.

4. HIPÓTEISIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

1) *Las ceramidas poseen un polimorfismo mecánico rico.*

Ya hemos comentado de la existencia de los diferentes fases termodinámicas que se pueden observar en una fase lamelar cuando se varía la temperatura: fase cristal líquido, también denominada estado fluido o líquido desordenado y típicamente designada como L_α o L_d , y 2) fase gel, también denominada estado sólido ordenado y típicamente designada como L_β o S_0 . La conformación característica de los fosfolípidos es muy diferente en ambas fases. Así, el orden es mucho mayor en el denominado estado gel que en el estado fluido. Además, en el caso de ciertos PLs puros existen algunas fases intermedias: 3) fase $L_{\beta'}$, en la que las cadenas hidrocarbonadas están inclinadas, y 4) fases P_β y $P_{\beta'}$, designadas en la bibliografía como fase ripple por tener forma ondulada.

En el caso particular de ceramidas, existe la tendencia natural en considerar a la ceramida como un lípido de tipo sólido, altamente condensado y que confiere a las biomembranas rigidez y un alto empaquetamiento. En efecto, mediante experimentos de reología superficial de cizalla se ha medido un modulo de cizalla que es varios órdenes de magnitud que el de otras mezclas biológicamente relevantes. Por esta razón se piensa que la ceramida puede formar complejos más sólidos y rígidos que otros sistemas lipídicos también de tipo sólido. Sin embargo se ha demostrado recientemente [103] que las ceramidas pueden tener fases tanto sólidas como expandidas. Dependiendo de la temperatura y de la presión se han identificado tres fases para C16Cer: una fase sólida (S), una fase liquido condensada (LC) y una fase expandida (LE). Además se han observado transiciones de segundo orden $S \rightarrow LC$ a temperatura ambiente y una transición de primer orden $LC \rightarrow LE$ a temperaturas fisiológicas. Este comportamiento fásico hace de la ceramida un lípido con propiedades polimórficas particulares.

2) *Los dominios ricos en ceramida podrían inmovilizar y acumular las proteínas que intervienen en procesos de señalización celular.*

Por otra parte, se cree que la ceramida podría concentrar in vivo a las proteínas de señalización en dominios ricos en ceramida. Existe una evidencia experimental que muestra como los anticuerpos contra la SMasa ácida (FITC-anticuerpos) y contra ceramida (Cy3-anticuerpos) colocalizan en las membranas plasmáticas después de su activación celular mediante numerosos mecanismos de activación de los receptores de señales (CD95, CD40, infección o bien radiación γ , entre otros) [104, 105, 106]. El nuevo modelo de señalización transmembranaria sugiere que la SMase se active mediante su estimulación de los receptores de señalización, de tal manera que la ceramida recién formada podría formar dominios sólidos para formar grandes plataformas (clustering). Estas plataformas ricas en ceramidas podrían servir para acumular y agregar los receptores de señalización (capping), actuando como amplificadores de la señal. Este escenario, solo sería posible si las propiedades mecánicas de la ceramida fueran adecuadas para coalescer a partir de pequeños dominios y tener la capacidad de secuestrar las proteínas receptoras de señales. La agregación descrita de las proteínas en dominios de ceramida puede ser consecuencia de las particulares propiedades viscoelásticas de cizalla de la ceramida [48]. Como ya hemos comentado las ceramidas presentan una elasticidad de cizalla ($G' \sim 90 \text{ mN/m}$) muy superior comparado con otros lípidos presentes en las biomembranas. Por lo tanto las ceramidas podrían ser particularmente eficientes en la concentración de proteínas de receptores de señalización

4.2. Objetivos

1) A pesar del rico comportamiento polimórfico encontrado para las ceramidas, las fases están caracterizadas mediante estudios estructurales y termodinámicos mediante el uso de microscopía de Ángulo Brewster, isothermas, isobaras, DSC o estudios de rayos X. Las distintas propiedades fisicoquímicas medidas por cada una de estas técnicas producen una asignación no homogénea de las fases encontradas. Así nos vemos obligados a clasificarlas de manera global entre fases sólidas (S_0 , LC, L_β , fase gel, etc) y fases fluidas (LE, L_α , L_o , etc). Ahora bien, el término fluido o sólido responde

inequívocamente a propiedades mecánicas del sistema, pudiéndonos encontrar matices dentro de las categorías de sólido o fluido. Así por ejemplo, mediante el estudio mecánico podremos diferenciar perfectamente entre un sistema sólido y un sistema gel. Por lo tanto **el primer objetivo de esta tesis es clasificar las diferentes fases termotrópicas encontradas para las ceramidas mediante parámetros mecánicos**. Para ello se estudiarán el comportamiento mecánico de monocapas de ceramidas bajo deformaciones de compresión y cizalla a diferentes estados de presión y temperatura.

2) Cuando la ceramida se sintetiza en la membrana plasmática mediante la acción de la SMase, las moléculas resultantes no se encuentran aisladas formando dominios puros de ceramida. Por el contrario, las ceramidas se ven localizadas en un entorno rico en esfingomielina y colesterol. La asociación de las ceramidas con la esfingomielina produce lo que llamamos dominios ricos en ceramida. La pregunta que se plantea es saber si las mezclas de esfingomielina/ceramida mantienen todavía las propiedades mecánicas asociadas a membranas formadas tan solo por ceramida. Por tanto un **segundo objetivo de esta tesis es comparar las propiedades mecánicas de membranas formadas a partir de mezclas de esfingomielina/ceramida con las propiedades mecánicas de ceramidas**. Para ello se llevará a cabo el estudio mecánico de monocapas formadas por mezclas de ceramida/esfingomielina.

3) Las propiedades viscoelásticas de membranas formadas a partir de mezclas de esfingomielina/ceramida podrían diferir sustancialmente de las propiedades mecánicas de las membranas de ceramidas, anulando en parte la hipótesis de “capping” protéico. Por ello, se quiere **comprobar que las membranas ricas en ceramidas son capaces de arrestar el movimiento de objetos embebidos en ellas**. Para ello se estudiará el movimiento browniano bidimensional de micropartículas suspendidas en monocapas formadas por mezclas de ceramida/esfingomielina.

Parte II
MATERIALES Y MÉTODOS

5 MATERIALES

5.1 Reactivos

Los experimentos en monocapas de Langmuir se realizaron con una subfase de agua. Agua de alta pureza se obtuvo mediante un sistema Milli-Q (de conductividad $<18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$; $\gamma = 72,6 \text{ mN/m}$ a 20°C ; Millipore, Billerica, MA).

5.2 Lípidos

La ceramida de huevo (eggCer) y la esfingomielina de huevo (eggSM) fueron suministradas por Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL) en polvo de alta pureza. Justo antes de su uso, las mezclas de eggCer / eggSM (1:0 mol, 9:1 mol, 2:1 mol, 1:1 mol, 1:2 mol, y 0:1 mol) se disolvieron en cloroformo (Sigma-Aldrich, St . Louis, MO) para alcanzar una concentración final de $0,5 \text{ mg / ml}$. Las soluciones madre se mantuvieron a -20°C .

5.3 Micropartículas

Como sonda del movimiento browniano interfacial se utilizaron partículas de polimetil metacrilato (PMMA) esféricas de tamaño micrométrico ($5,75 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro; Microparticles GmbH, Alemania)

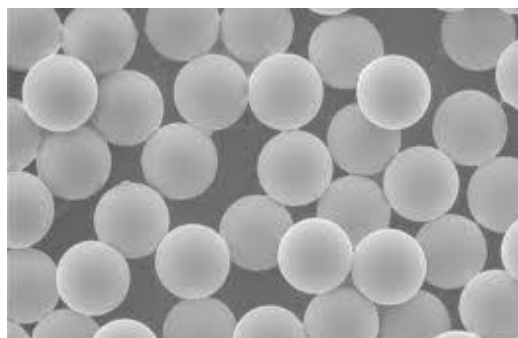


Figura 5.1. Imagen de microscopía electrónica de micropartículas de PMMA

6 MÉTODOS

Ya hemos comentado que las moléculas anfipáticas insolubles en agua pueden formar películas monomoleculares, denominadas monocapas de Langmuir, cuando son esparcidas sobre la superficie de una interfaz aire-agua.

A principio del siglo XX, Langmuir ideó un dispositivo denominado balanza de Langmuir que permite estudiar el comportamiento termotrópico de una monocapa registrando la variación de su presión superficial $\Pi = \gamma - \gamma_0$, (siendo γ la tensión superficial de la monocapa y γ_0 la tensión superficial de la subfase acuosa sobre la que ésta se adsorbe) en función del área A ocupada por cada molécula de lípido a concentración superficial y temperatura T dadas. Para ello, la balanza de Langmuir dispone de unas barreras que se pueden mover de manera continua u oscilatoria, modificando el área disponible de la monocapa (Figura 6.1). El observable presión superficial $\Pi(A)$ resulta ser, por tanto, un excelente descriptor energético por ser extremadamente sensible a cambios de composición, empaquetamiento y distribución lipídicos. Dichas monocapas presentan una elasticidad y viscosidad características que pueden ser determinadas mediante reología superficial dilacional y de cizalla.

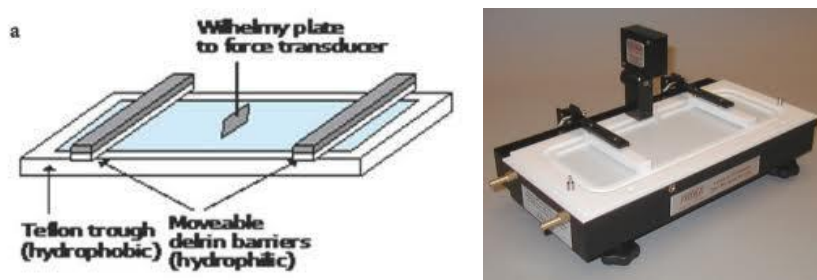


Figura 6.1 Esquema y fotografía de una balanza de Langmuir

6.1 Isotermas de compresión.

En termodinámica se define la compresibilidad de un sistema termodinámico como el cambio relativo de volumen frente a una variación de la presión. Y llamamos isoterma de compresión a la función $\Pi(A)$ cuando se somete a un sistema termodinámico a transformación cuasiestática de presión mientras su temperatura se

mantiene constante. En el caso de sistemas bidimensionales, y en particular en monocapas monomoleculares, podemos distinguir dos maneras experimentales de obtener una isoterma. Las isothermas por adición se obtienen añadiendo de manera sucesiva pequeñas alícuotas de la solución molecular en disolvente orgánico. Entre adiciones se espera el tiempo necesario para que se produzca la evaporación del disolvente y se alcance un estado de equilibrio, en el que el valor de la presión permanezca constante. Esta condición se alcanza rápidamente en estados de empaquetamiento más diluidos. Este protocolo supone una compresión hidrostática, donde la presión superficial aumenta siguiendo un camino quasi-continuo, minimizando posibles estreses debidos a compresiones mecánicas. Las isothermas de compresión se obtienen mediante la reducción del área accesible a la monocapa, preparada en un estado muy diluido ($\Pi \sim 0$), mediante las dos barreras de la balanza de Langmuir. Se trata de una compresión uniaxial y simétrica por estar las dos barreras acopladas, moviéndose a velocidad constante (típicamente 10 cm²/min).

En ambos casos, se registra la presión superficial Π en función del área molecular media A , obtenida como el cociente del área superficial total entre el número de moléculas que conforman la monocapa. La variación de presión causada por el cambio infinitesimal de área molecular define el módulo de elasticidad de equilibrio de la monocapa en cada estado de empaquetamiento;

$$E_0 = -A (\Delta\Pi/\Delta A)_T \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Pudiendo ser calculado mediante la derivada numérica de la isoterma Π - A obtenida por cualquiera de los dos métodos anteriormente descritos.

Además existe la posibilidad de producir una compresión hidrostática (isotrópica) mediante la utilización de una balanza circular que fue diseñada y construida en el transcurso de esta tesis, basándose en el diseño previamente publicado [107] Este dispositivo permite la medida de la presión superficial en función de una compresión isotrópica producida por una disminución radial del área disponible para la monocapa. La bandeja cónica fue tallada en una barra de Teflón monolítica (25 cm de diámetro superior, 10 cm de profundidad, $\theta = 30^\circ$ de inclinación). A medida que se alza la bandeja circular, manteniendo la elevación del agua fija a través del

principio de vasos comunicantes, la monocapa se va comprimiendo uniformemente desde un área inicial máxima,

$$A_0 = \pi R_0^2 = 160 \text{ cm}^2 \quad (\text{Ec. 6.2})$$

(siendo R_0 el radio inicial), hasta un área final,

$$A(h) = \pi(R_0 - h \tan \theta)^2 \quad (\text{Ec. 6.3})$$

donde h es la elevación con respecto a la posición inicial, medida con un tornillo micrométrico.

De manera análoga a la compresión uniaxial se puede definir el módulo de compresión isotrópico como la variación de presión causada por el cambio isotrópico infinitesimal del área molecular, pudiendo ser calculado mediante la derivada numérica de la isoterma $\pi - A$ obtenida en la balanza hidrostática.

$$-A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)^{iso} = K \quad (\text{Ec. 6.4})$$

6.1 Rheología de compresión oscilatoria

En estos experimentos, un estado determinado de empaquetamiento de lípidos se alcanza comprimiendo la monocapa diluida a una velocidad de compresión muy baja ($5 \text{ cm}^2/\text{min}$). En este estado de la superficie definido por (Π_0, A_0) , la monocapa se deforma bajo la acción de compresión sinusoidal provocada por el movimiento uniaxial de la barrera, la cual fuerza el área disponible según la siguiente relación:

$$A(t) = A_0[1 + u_0 \sin(\omega t + \phi_u)] \quad (\text{Ec. 6.5})$$

donde ω es la frecuencia de excitación, u_0 la amplitud de la deformación, la cual es relativa a la área inicial como $u_0 = (A - A_0)/A_0$ y ϕ_u representa una posible fase inicial. La presión lateral se registra de forma simultánea a la variación del área en función en el tiempo. Según la respuesta de la monocapa, podemos distinguir dos regímenes. En el régimen lineal, la dependencia de $\Pi(t)$ tiene un perfil sinusoidal con la misma frecuencia que la onda de deformación:

$$\sigma(t) = \pi(t) - \pi_0 = \sigma_0 \sin(\omega t + \Phi_\pi) \quad (\text{Ec. 6.6})$$

donde Π_0 es la presión inicial, σ_0 la amplitud del esfuerzo y ϕ_π un factor de fase que representa el retraso impuesto por fricción viscosa de la respuesta. El módulo de compresión elástica E y la viscosidad de compresión η_E se calculan como:

$$E' = (\sigma_0/u_0) \cos \Phi \quad (\text{Ec. 6.7})$$

y

$$E'' = (\sigma_0/u_0) \sin \Phi \quad (\text{Ec. 6.8})$$

donde ϕ es la diferencia de fase entre esfuerzo y deformación, $\phi = \phi_u - \phi_\pi$. Si la respuesta $\pi(t)$ es no lineal, se puede utilizar un desarrollo en serie de Fourier para ajustar con precisión los datos (véase más adelante). Hay que tener en cuenta que el método es muy sensible. Aunque los esfuerzos se miden con una incertidumbre baja, $\delta\sigma \approx \pm 0.01$ mN/m, la mayoría de los errores experimentales surgen de la dificultad de reproducir estados superficiales idénticos en experimentos independientes y los parámetros viscoelásticos se ven afectados por un error experimental total de $\delta E, \delta\omega\eta_E = \pm 1$ mN m.

Análisis no lineal en reología de compresión oscilatoria

Si la monocapa se deforma por efecto de la compresión la respuesta $\Pi(t)$ se puede encontrar de forma no lineal, en esta situación se usa una expansión en serie de Fourier para ajustar con precisión los datos:

$$\pi(t) = \pi_0 + \sum_k \sigma_0^{(k)} \sin(k\omega t + \Phi_\pi^{(k)}) \quad (\text{Ec. 6.9})$$

donde $\sigma_0^{(k)}$ representa la amplitud de cada uno de los armónicos. Alternativamente, el espectro de frecuencia y las amplitudes de los armónicos se pueden obtener a partir de la transformada de Fourier en $\pi(t)$. Dentro del régimen lineal sólo el pico fundamental está presente en el espectro de potencia, mientras que en el régimen no lineal se pueden observar otros picos menos intensos, que corresponden a los armónicos más altos (2).

La figura 6.2 muestra la evolución temporal del esfuerzo de compresión medido en los experimentos con barrera oscilatoria en respuesta a una dilatación sinusoidal ($\omega_0=0.2094 \text{ s}^{-1}$, $A-A_0/A_0=0,04$) para lípidos de ceramida y esfingomielina. El estado inicial de empaquetamiento superficial corresponde a una presión superficial de $\Pi_{\text{bil}} = 30 \text{ mN/m}$.

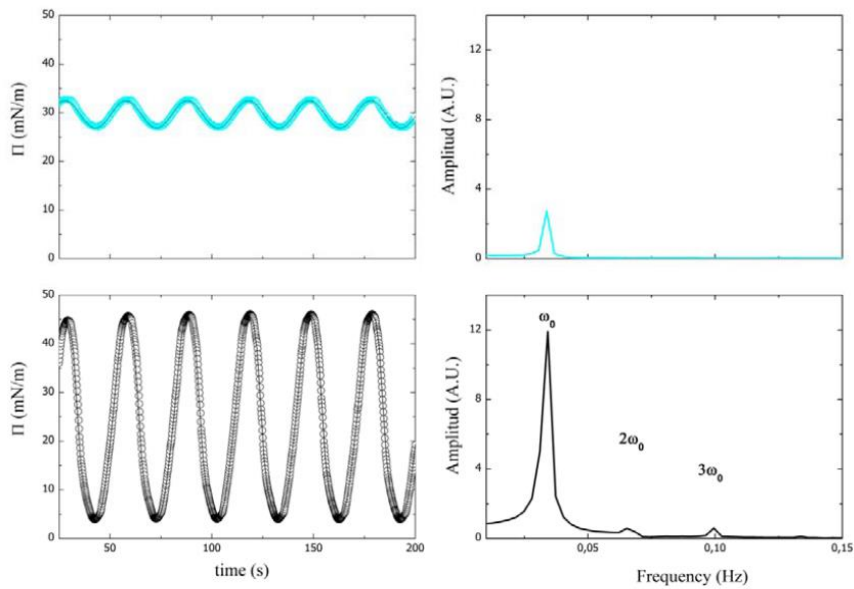


Figura 6.2. Izquierda) trazas temporales de las funciones de esfuerzo para eggCer (abajo) y eggSM (arriba) de monocapas sometidas a movimientos oscilatorios de barrera (a $\omega_0=0,2094 \text{ s}^{-1}$ y amplitud de deformación 4%). Las líneas continuas representan ajustes a las ecuaciones 6.6 y 6.9, respectivamente para eggSM y eggCer. La temperatura es de 25°C . **Derecha)** Transformada de Fourier de los las trazas temporales de la parte izquierda.

Los símbolos corresponden a los puntos experimentales y las líneas continuas representan los ajustes a las ecuaciones S2 y S5, para

eggSM y eggCer respectivamente. Para eggSM, la respuesta es una única curva sinusoidal simétrica correspondiente a la respuesta lineal de una deformación monocromática. Sin embargo, la respuesta al esfuerzo registrada para eggCer muestra valles más amplios y crestas estrechas indicativos de la presencia de componentes no lineales en frecuencias más altas que la excitación fundamental ω_0 . La no linealidad puede ser detectada fácilmente en la transformada de Fourier de la función $\Pi(t)$ (Figura 6.2; paneles de la derecha). Para eggSM se observa un solo pico, correspondiente al modo fundamental y por tanto a una respuesta lineal característica. Sin embargo, para eggCer, una serie de armónicos ($k\omega_0$) múltiplos de la frecuencia fundamental (ω_0) se observan dentro de la respuesta, característico de una respuesta no lineal, a partir de una cierta amplitud de deformación. En este caso concreto, el régimen no lineal se observa a deformaciones mayores de *ca.* 7%.

6.2. Rheología de cizalla oscilatoria

Para los experimentos de reología de cizalla, se utilizó un reómetro oscilatorio (Physica MCR301, Anton Paar) equipado con un rotor bicónico (68,3 mm de diámetro, ángulo del cono 5°) (ver figura 6.3). El control de temperatura ($\pm 0,1$ °C) se realiza mediante un elemento Peltier asistido por un termostato externo del agua. El cono doble se puede colocar de forma muy precisa en la posición de interfaz a través de la medición de la fuerza normal presente en la superficie de la interfaz líquido / aire.

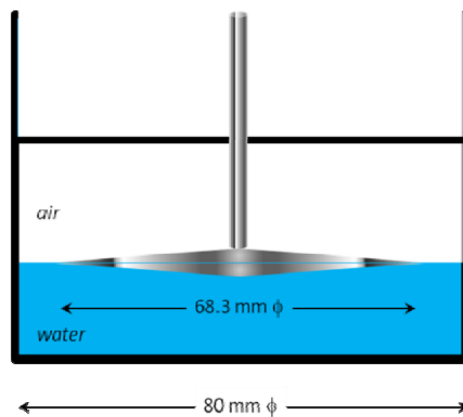


Figura 6.3. Geometría y dimensiones de la cubeta y del rotor bicónico utilizados en la reología de cizalla (instrumento MCR301 Anton Paar).

En este caso el estado termodinámico de la monocapa (Po, A0) se produce mediante la adición de las moléculas. Después, una deformación sinusoidal de amplitud γ_0 se aplica a la monocapa con una frecuencia ω , es decir, $\gamma = \gamma_0 \sin \omega t$. La respuesta de torsión en el eje normal (σ) se mide con una precisión ($\delta\sigma \approx \pm 10 \mu\text{N/m}$). Si se detecta la respuesta al esfuerzo de manera sistemáticamente ruidosa ($\sigma < \delta\sigma$), el software interpreta los datos como erróneos, por lo tanto se rechaza de forma automática para los análisis posteriores. En el régimen lineal, el esfuerzo interfacial de cizalla está compuesto por una componente elástica instantánea $\sigma_E = \gamma_0 G' \sin \omega t$ determinado por el módulo de almacenamiento G' más un esfuerzo de flujo retardado $\sigma_V = \gamma_0 G'' \cos \omega t$, determinado por el módulo de pérdidas G'' . La respuesta total a la deformación está dada por $\sigma(t) = \sigma_E + \sigma_V$.

La viscosidad superficial de cizalla se define como $\eta_s = G''/\omega$, y se mide como el esfuerzo necesario para hacer que la monocapa fluya a una velocidad de cizallamiento $\dot{\gamma} = \gamma_0 \omega$. como ya se ha comentado, un estado de empaquetamiento determinado se alcanza por la adición gota a gota de moléculas en solución orgánica. La monocapa se deja equilibrar durante una hora, y luego se pre-cizalla a una frecuencia fija (típicamente 1 s^{-1} , 1% de amplitud de cizallamiento) hasta que se registre un registro constante de los parámetros viscoelásticos. A pesar de la alta resolución en las mediciones de la torsión, la reproducibilidad experimental está limitada, como en el caso de reología de compresión, por la capacidad de reproducir estados de monocapa idénticos en diferentes experimentos ($\delta G \approx \pm 1 \text{ mN/m}$). Así, la resolución del instrumento MCR301 es 0.010 mN/m para el esfuerzo interfacial de cizalla. A pesar de esta alta resolución, la reproducibilidad experimental está limitada por la capacidad de reproducir estados de monocapa idénticos en diferentes experimentos. Esto se ilustra por la figura 6.4 cuyos resultados han sido obtenidos a partir de dos diferentes experimentos hechos en dos sistemas diferentes.

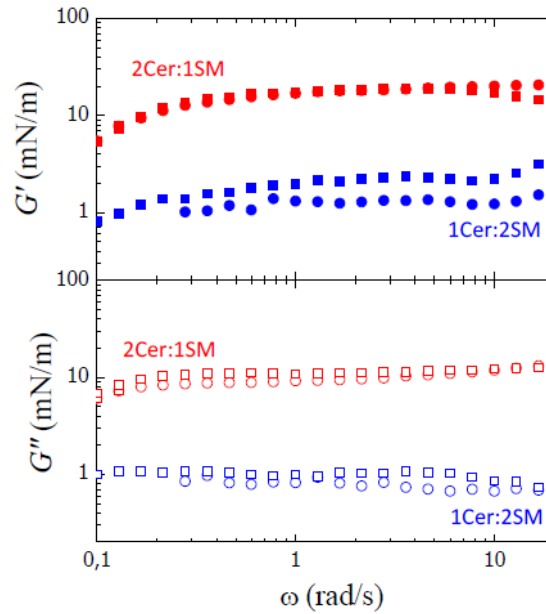


Figura 6.4. Reproducibilidad típica en experimentos de reología de cizalla. Cada curva corresponde a un experimento independiente realizado en diferentes muestras del mismo sistema.

En realidad una composición diferente da lugar a un gran cambio en los valores absolutos de los parámetros viscoelásticos, pero dos mediciones independientes realizadas en diferentes monocapas en el mismo estado podrían eventualmente diferir en ± 1 mN/m. Esta es de hecho, la incertidumbre total experimental en los presentes experimentos reológicos de cizalla ($\delta G = \pm 1$ mN/m), un valor similar al error global en la reología de compresión.

6.3 Microscopía de Ángulo Brewster

La microscopía de ángulo de Brewster (BAM) es una técnica óptica que permite la observación y detección de películas a partir de unos pocos nanómetros de grosor, siendo muy útil para caracterizar películas orgánicas sobre agua o un medio acuoso, como es el caso de los lípidos y otros compuestos especialmente anfifílicos.

Cuando un haz de luz polarizada-p, es decir polarizada paralelamente al plano de incidencia, incide sobre un medio dieléctrico, hay un ángulo de incidencia determinado, llamado de Brewster, donde no se produce reflexión alguna. Toda la luz se

refracta en el medio. El ángulo de Brewster está relacionado con los índices de refracción de dos medios ópticos mediante la relación:

$$\tan \alpha = n_{\text{substrato}} / n_{\text{aire}} \quad (\text{Ec. 6.10})$$

Para la interface aire/agua, este ángulo toma el valor de 53° que es cuando no se produce reflexión. Si se forma una película sobre agua, entonces la relación anterior deja de cumplirse para este ángulo y aparece una reflexión que puede detectarse y dar lugar a una imagen de la película. La intensidad reflejada depende del espesor de la película y de sus parámetros ópticos. En el caso de una monocapa orgánica típica (espesor 2 nm) ésta es del orden de una millonésima parte de la intensidad incidente. Esto no es mucho pero es aún suficiente para producir, mediante un objetivo de microscopio, imágenes bien contrastadas y con una buena resolución espacial.

El sistema BAM debe ser visto sobretodo como un microscopio, puesto que su sistema de formación de imágenes se realiza a través de un objetivo de microscopio sobre una cámara CCD. Pudiendo dar lugar a buenos contrastes en capas muy delgadas, incluso cuando estas capas son monomoleculares, lo que le convierte en un instrumento de muy alta sensibilidad para obtener imágenes de películas muy delgadas y estructuras superficiales que se formen sobre materiales dieléctricos transparentes, sobre todo los que se forman sobre la superficie del agua. Ello permite además obtener información cuantitativa de las imágenes (por ejemplo, la distribución de tamaño de fases) con una resolución lateral de hasta una micra, dependiendo del objetivo de microscopio utilizado.

El BAM consiste en una unidad optomecánica (Figura 6.5) formada por dos bancos ópticos formando el ángulo de Brewster, con la normal a la superficie del agua. En el banco óptico de iluminación se encuentra el láser de Helio-Neón y el polarizador. El banco óptico de detección incluye un objetivo de microscopio de larga distancia de trabajo, un analizador y la cámara CCD. Completa el equipo una fuente de alimentación para el láser de He-Ne y un ordenador al cual se conecta la cámara CCD en la que se captan las imágenes que se producen de la superficie del agua, en la situación de ángulo de reflexión de Brewster.

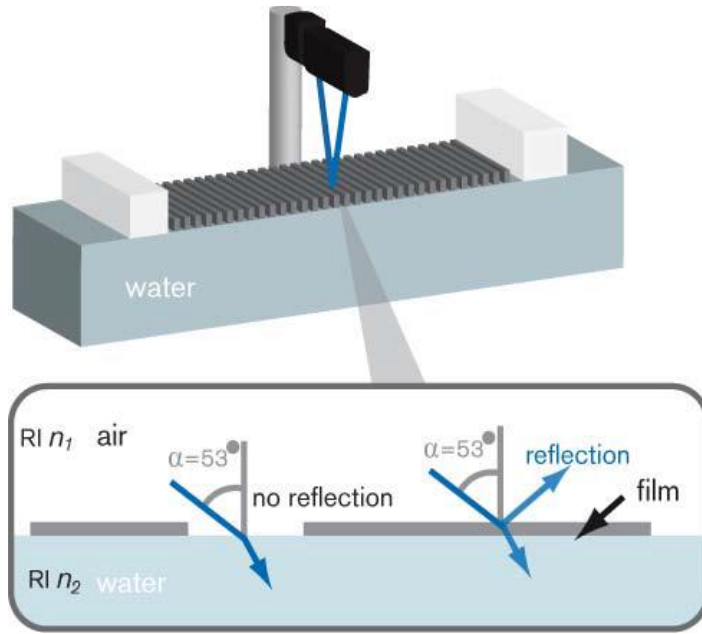


Figura 6.5. Principio de la microscopía de ángulo Brewster.

6.4 Particle Tracking

La metodología denominada como “Particle Tracking” consiste en la observación del movimiento individual de partículas en un medio. En nuestro caso, se utilizaron partículas de PMMA esféricas de tamaño micrométrico ($5,75\ \mu\text{m}$ de diámetro; Microparticles GmbH, Alemania) como sonda del movimiento interfacial. Y el medio lo constituye la monocapa lipídica. Las monocapas de lípidos se formaron utilizando el procedimiento gota a gota sobre la subfase acuosa contenida en una cubeta de Langmuir instalada en la base del microscopio. Después de la evaporación del disolvente (aprox. 60 min), se esparcieron $5\ \mu\text{l}$ de suspensión de partículas (1% de peso en agua-isopropanol 1:1 v/v) cuidadosamente sobre la monocapa preformada de lípidos, dejando al sistema equilibrar durante 30 min. Las micropartículas se observaron por microscopía óptica con resolución temporal utilizando un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000, de campo claro, $20\times$) y una cámara CCD enfriada (Nikon DS-1QM, 1Mpx) a una resolución espacial de $0,8\ \mu\text{m}/\text{píxel}$. Las película (20s de largo; $M \approx 280$ imágenes) se registraron a 14 fps. Para reducir al mínimo las interacciones partícula-partícula, se trabajó en condiciones de partículas diluidas (el número de

partículas N suele ser aprox. 15-20 por $800 \times 800 \mu m^2$). El movimiento browniano se controló de forma simultánea para todas las partículas contenidas en el mismo campo. Las imágenes han sido analizadas *off-line* utilizando *Multitracker*, un software de rastreo de partículas de dominio público que se ejecuta bajo ImageJ (J. Kuhn, Univ. Texas). La trayectoria para cada partícula i se obtiene como posiciones absolutas en imágenes consecutivas $R_i(t_n)$ ($t_n = n \tau$, con $n=1, \dots, M$, y M siendo el número total de fotogramas de una película, y τ el tiempo de muestreo). Los errores de deriva fueron eliminados de manera eficiente mediante el cálculo de los desplazamientos relativos $\vec{r}_i(t_n) = \vec{R}_i(t_n) - \vec{R}_{CM}(t_n)$ respecto a la posición del centro de masa, $\vec{R}_{CM}(t_n) = [\sum_{j=1 \neq i}^{N-1} m_j \vec{R}_j(t_n)] / \sum_{j=1}^{N-1} m_j$ (el índice de la suma j pasa por las $N-1$ otras partículas ($j \neq i$) en una imagen). Para partículas idénticas $m_i = m$, se obtiene $\vec{R}_{CM}(t_n) = [\sum_{i=1}^N \vec{R}_i(t_n)] / (N - 1)$, siguiendo el esquema de microreología “de dos puntos” propuesto por Levine y Lubensky [108], un método que toma las correlaciones cruzadas múltiples de partículas para eliminar las contribuciones no correlacionadas debidas a la deriva y heterogeneidades dinámicas locales. Los desplazamientos cuadráticos de dos partículas a diferentes tiempos con retardo Δt se calculan como:

$$MSD_{2point}(\Delta t) = \langle \Delta \vec{r}_{ij}^2(\Delta t) \rangle_{MN} = \langle [\Delta \vec{r}_{ij}(t_n + \Delta t) - \Delta \vec{r}_{ij}(t_n)]^2 \rangle_{MN} \quad (\text{Ec. 6.11})$$

en el que el desplazamiento relativo de un par de partículas (ij) se define como $\Delta r_{ij} = r_i - r_j$ ($i \neq j$). El promedio se lleva a cabo en los diferentes imágenes M separadas por un lapso de tiempo Δt en una secuencia dada (time average) y sobre todos los $(N-1)^2$ pares de partículas en una tramo de tiempo determinada (ensemble average). Las trayectorias brownianas de los dos puntos deben seguir la ecuación de difusión de Einstein; en 2D [109]:

$$MSD_{2points}(t) = 8Dt \quad (\text{Ec. 6.12})$$

donde D es el coeficiente de difusión, que se calcula como la pendiente de la primera parte de la trayectoria de difusión MSD (típicamente por $t < 1s$). Tiempos de retardo más largos causan importantes efectos de truncamiento de las trayectorias calculadas, que generalmente se desvían de las estadísticas del movimiento

browniano [109]. Como prueba de consistencia, varias películas fueron grabadas en diferentes lugares de una muestra dada y en diferentes muestras en condiciones equivalentes, y el valor de D se encontró similar entre ellos. Por último, D se calculó como un promedio estadístico con su correspondiente desviación estándar.

6.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica termoanalítica que consiste en calentar una muestra (S en la Figura 1) así como un compuesto de referencia (R) de tal manera que la temperatura es en todo momento igual en R y en S. Esto se consigue midiendo las temperaturas con sensores y justando las potencias de calentamiento. Las velocidades de calentamiento (en grados/s) aumenta linealmente como función del tiempo.

El principio básico subyacente a esta técnica es que, cuando la muestra experimenta una transformación física tal como una transición de fase, se necesitará que fluya más (o menos) calor a la muestra que a la referencia para mantener ambas a la misma temperatura. La DSC detecta por tanto transiciones que implican intercambio de energía, sea almacenamiento de calor (procesos endotérmicos) o liberación de calor (procesos exotérmicos). Ejemplos de estos procesos son las transiciones de fase sólido-sólido o sólido-líquido por ejemplo), procesos de cristalización, oxidaciones irreversibles, deshidrataciones, etc... Así por ejemplo, cuando una muestra sólida funde a líquida se requerirá dar más calor a la muestra para aumentar su temperatura a la misma velocidad que la de referencia. Esto se debe a la absorción de calor de la muestra que experimenta una transición de fase endotérmica desde sólido a líquido.

La representación del calor absorbido o despedido (mostrado como picos positivos o negativos respectivamente) frente a la temperatura es lo que se denomina diagrama DSC o, dado que se realiza frente a la temperatura, termograma. Un ejemplo de termograma se encuentra en la Figura 6.6. Las áreas bajo una curva DSC pueden ser utilizados para calcular entalpías de transiciones. Este cálculo se realiza integrando el pico correspondiente a una transición dada. Así, la entalpía de la transición puede ser expresada por la siguiente ecuación:

$$\Delta H = C A \quad (\text{Ec. 6.13})$$

donde ΔH es la entalpía de la transición, C es la constante calorimétrica y A es el área bajo la curva. La constante calorimétrica variará de instrumento a instrumento, y puede ser determinada

analizando una muestra bien caracterizada con entalpías de transición conocidas.

Esta técnica también resulta muy adecuada para comprobar la pureza de un material, examinando la forma y la anchura del pico obtenido.

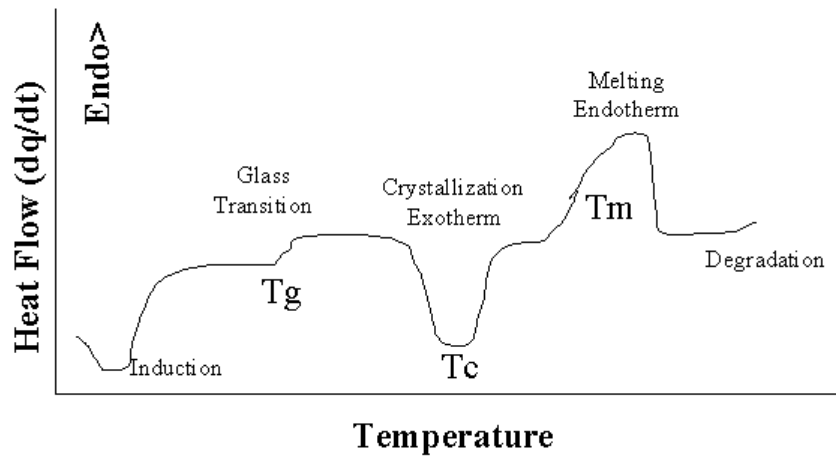


Figura 6.6. Termograma típico de transiciones termodinámicas de polímeros

Parte III
RESULTADOS y DISCUSIÓN

7 RESULTADOS

7.1 Reología de compresión de monocapas de ceramidas

Isotermas de compresión.

La figura 7.1A muestra la curva presión vs área (Π -A) de las isotermas de eggCer medidas a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ \text{C}$) en las dos geometrías de compresión: uniaxial y radial (isotrópica). El recuadro interno muestra también una isoterma punto a punto, obtenida mediante la adición sucesiva de diferentes cantidades de lípidos sin compresión de las monocapas. Todas las isotermas comparten varias características. La isoterma de compresión obtenida en la geometría uniaxial es cualitativamente similar a la recientemente obtenida por Busto et al. [110] para ceramida sintética C16. Para áreas moleculares por encima de 75 \AA^2 , las presiones superficiales se encuentran cercanas a cero, compatibles con el estado gaseoso. Bajo una compresión uniaxial y por debajo de 75 \AA^2 , la presión aumenta hasta un pseudo-plateau a una presión de 5 mN/m , mientras que mediante compresión isotrópica la presión permanece cercana a cero. Un comportamiento similar al encontrado mediante compresión uniaxial se observa para las isotermas punto a punto tal como se muestra en el recuadro interno de la Figura 7.1A.

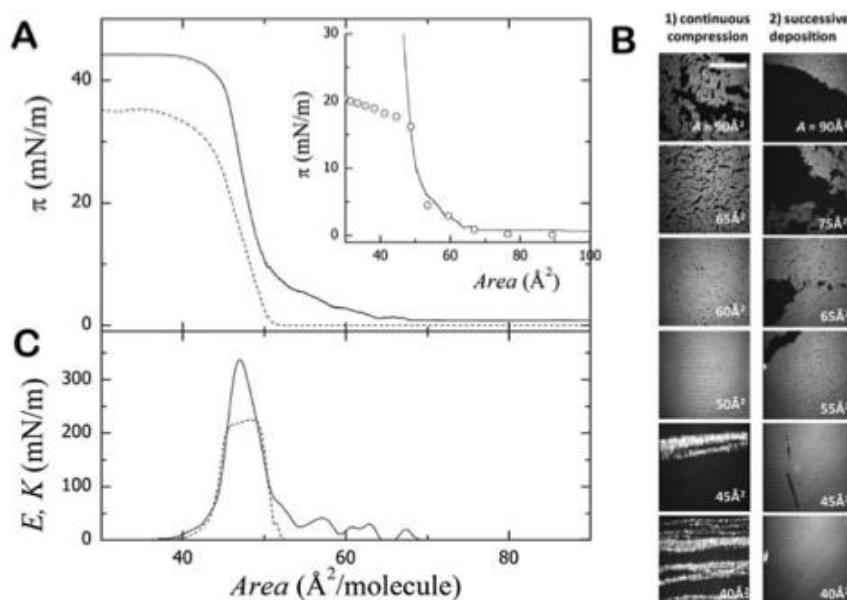


Figura 7.1. **A)** Isotermas de presión superficial vs área superficial (π -A) de monocapas de ceramida de huevo medidas en compresión uniaxial (línea negra) e isotrópica (línea de puntos), a una tasa de 5 cm²/min. Recuadro interno: isoterma medida con deposiciones sucesivas de lípido. La línea de color negro continua representa la isoterma de compresión obtenida por el método uniaxial. **B)** Micrografías BAM representativas de los diferentes estados alcanzados por la monocapa en diferentes métodos (barra de escala 100 micras). Las zonas brillantes observadas tras la compresión uniaxial a 45 Å² corresponden a líneas gruesas de defectos de monocapas causados cerca del colapso (estas líneas se encuentran orientadas en paralelo a las barreras, por lo tanto perpendicular a la dirección de compresión). **C)** módulos de compresión elástica, K isotrópica (línea de puntos) y E uniaxial (línea de color negro) de las monocapas de eggCer calculadas a partir de las isotermas de compresión en A) utilizando las ecuaciones 7.1 y 7.2, respectivamente.

Para áreas superficiales más pequeñas, cerca de 50 Å², las tres isotermas aumentan súbitamente y entran en un régimen de colapso en $A \approx 40$ Å². El colapso observado en la compresión uniaxial se caracteriza por una presión más alta ($\pi^{(Col)} \approx 45$ mN/m) que la observada tras la compresión isotrópica ($\pi^{(Col)} \approx 35$ mN/m) o punto a punto ($\pi^{(Col)} \approx 16$ mN/m). Esto podría sugerir que las capas están atrapadas en diferentes configuraciones metaestables, una situación frecuente en la región de colapso [111]. Las diferencias entre las presiones superficiales medidas en la cubeta de Langmuir y en la cubeta cónica podrían explicarse de la siguiente manera: al bajar el nivel del líquido en la cubeta cónica, ciertas partes de la monocapa se podrían depositar en la pared de la cubeta, como se observa en van Hunsel and Joos [112]. En las monocapas de ceramidas en la cubeta de Langmuir, tales pérdidas potenciales son sin embargo limitadas.

Para obtener más información acerca de la estructura de monocapas de eggCer, se tomaron imágenes de BAM durante la compresión uniaxial (ver figura 7.1B, panel izquierdo). La monocapa es heterogénea en el estado diluido ($\pi < 1$ mN/m): las regiones de carácter gaseoso (zonas oscuras) coexisten con las regiones de carácter sólido (zonas brillantes). A mayor compresión, las regiones gaseosas desaparecen progresivamente, sus formas irregulares evolucionan en defectos circulares más pequeños mientras que las regiones sólidas se funden en grandes plataformas. Por encima de 2 mN/m, la monocapa es homogénea y muy densa. Cerca del colapso, la monocapa se vuelve más espesa, en una estructura más gruesa,

como indica los múltiples pliegues que se visualizan a bajas áreas superficiales (véase la Figura 7.1B, panel de la izquierda), compatible con los mecanismos de colapso habituales descritos en la referencia 111. Las imágenes tomadas para las isothermas punto a punto son similares, sin embargo, no se observan en la región colapso los pliegues tridimensionales (Figura 7.1B, panel derecho).

El módulo de compresión, K , está relacionado con el aumento de presión superficial causado por la compresión isotrópica de la monocapa. Para monocapas insolubles, el módulo de compresión isotrópico K se obtiene a partir de la derivada numérica de las isothermas Π - A medidas en la cubeta circular, en donde el área se varia isotrópicamente con la disminución del radio R de la cubeta:

$$K = -A \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T^{(iso)} = -\frac{R}{2} \left(\frac{\delta\pi}{\delta R} \right)_T \quad (\text{Ec. 7.1})$$

El módulo de compresión uniaxial E , está relacionado con el cambio en la presión de la monocapa causado por una compresión uniaxial. Puede ser calculado a través de la derivada numérica de las isothermas Π - A medidas en compresión lateral de monocapas en la cubeta de Langmuir con el plato en paralelo a las barreras de compresión:

$$E = -A \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T^{(uniax)} = -A \left(\frac{\delta\pi}{\delta A} \right)_T \quad (\text{Ec. 7.2})$$

La figura 7.1B muestra los valores de los dos módulos (K y E), calculados a partir las respectivas isothermas de compresión en la figura 7.1A, usando las Ecs. 7.1 y 7.2, respectivamente. En el régimen diluido ($A > 50 \text{ \AA}^2$), las monocapas son altamente compresibles ($K \approx 0 \text{ mN/m}$, $E < 50 \text{ mN/m}$). Sin embargo, por debajo de 50 \AA^2 , se observa que ambos módulos aumentan repentinamente con la disminución del área superficial. Cuando se comprime por debajo de 50 \AA^2 , los módulos se incrementaron hasta un valor máximo ($K_{\text{máx}} \approx 220 \text{ mN/m}$, $E_{\text{máx}} \approx 340 \text{ mN/m}$; ver Figura 7.1C). Los módulos máximos, equivalentes a una compresibilidad mínima, corresponden a presiones cercanas a la presión biológicamente

relevante en la bicapa ($\Pi_{bil} \approx 30 \text{ mN/m}$) [113]. Por encima de este máximo, los módulos de compresión disminuyeron, señalando el inicio del colapso (la saturación de presión). A áreas $A \approx 50 \text{ Å}^2$, los valores del módulo de compresión uniaxial son sistemáticamente mayores que los del módulo de compresión isotrópica ($E > K$), un hecho que podría estar relacionado con la existencia de un módulo de cizalla finito: $E = K + G$. La relación entre G , E y K , sin embargo, sólo es válida para los sólidos, en ausencia de relajación [114].

Con el fin de comprobar la influencia de posibles relajaciones, hemos medido las presiones superficiales a diferentes velocidades de compresión (figura 7.2). Observamos que sólo existe una diferencia entre la presión superficial medida con placas paralelas y perpendiculares a las barreras respectivamente, a altas velocidades de compresión, es decir, cuando la relajación no tiene tiempo suficiente para ser completada. Los datos de la figura 7.2 muestran el cruce entre el régimen líquido y el régimen sólido para velocidades de deformación del orden de $u_c \approx 50 \text{ cm}^2/\text{min} \approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Las características de tipo sólido emergen solamente en $du/dt > \dot{u}_c$; y la respuesta mecánica se convierte ahora en anisotrópica, es decir $\Pi_{||} > \Pi_{\perp}$, y $G > 0$ (ver Figura 7.2). Sin embargo, en la compresión realizada más lentamente, $du/dt < \dot{u}_c$, el sistema se relaja y se vuelve similar a un fluido; por lo que $G = 0$, en presiones parecidas y medidas por ambos sensores. En los datos mostrados en la figura 7.1, ha habido el tiempo suficiente para permitir una relajación completa. En la región de colapso, las diferencias entre K y E son probablemente debidas a los efectos fuera del equilibrio mencionados anteriormente, en particular, a las diferencias en la textura, como se observa en la Figura 7.1B. Los datos de la Figura 7.2 sugieren por tanto que el tiempo característico de la relajación viscoelástica es del orden de minutos.

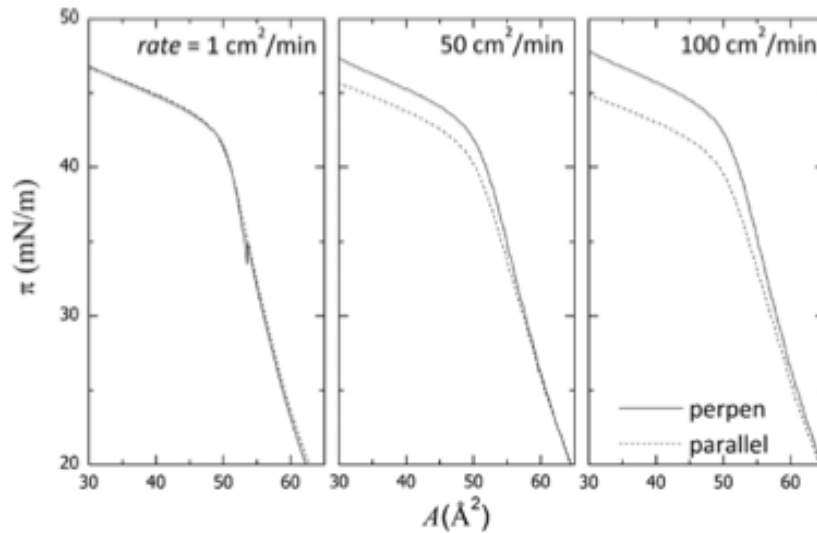


Figura 7.2. Anisotropía en las isothermas de compresión registradas a diferentes velocidades de compresión. Las líneas continuas corresponden a las isothermas obtenidas utilizando un plato de Whilhelmy paralelo a las barreras de la cubeta de Langmuir y las líneas punteadas a las obtenidas con un plato perpendicular a las barreras.

Reología de compresión oscilatoria

La respuesta dinámica de una compresión uniaxial, de amplitud variable, se midió en experimentos de oscilación realizados a una frecuencia constante ($\omega = 2\pi / T = 0,21 \text{ s}$; periodo $T = 30 \text{ s}^{-1}$). Las amplitudes de deformación exploradas variaron de 0,3% hasta 10% del área superficial de equilibrio inicial. Debido a que las grandes deformaciones de compresión dan lugar a cambios de fase de las monocapas; a bajas presiones ($\Pi < 1 \text{ mN/m}$, equilibrio sólido-gas) y a altas presiones ($\Pi > 40 \text{ mN/m}$, colapso de la monocapa); el estudio reológico se limitó a las regiones en las que la monocapa es homogénea y sólida. La figura 7.3A muestra la variación de área típica (deformación) impuesta en el régimen lineal ($\Delta A/A < 0,02$; panel izquierdo) y no lineal ($\Delta A/A > 0,02$, panel derecho).

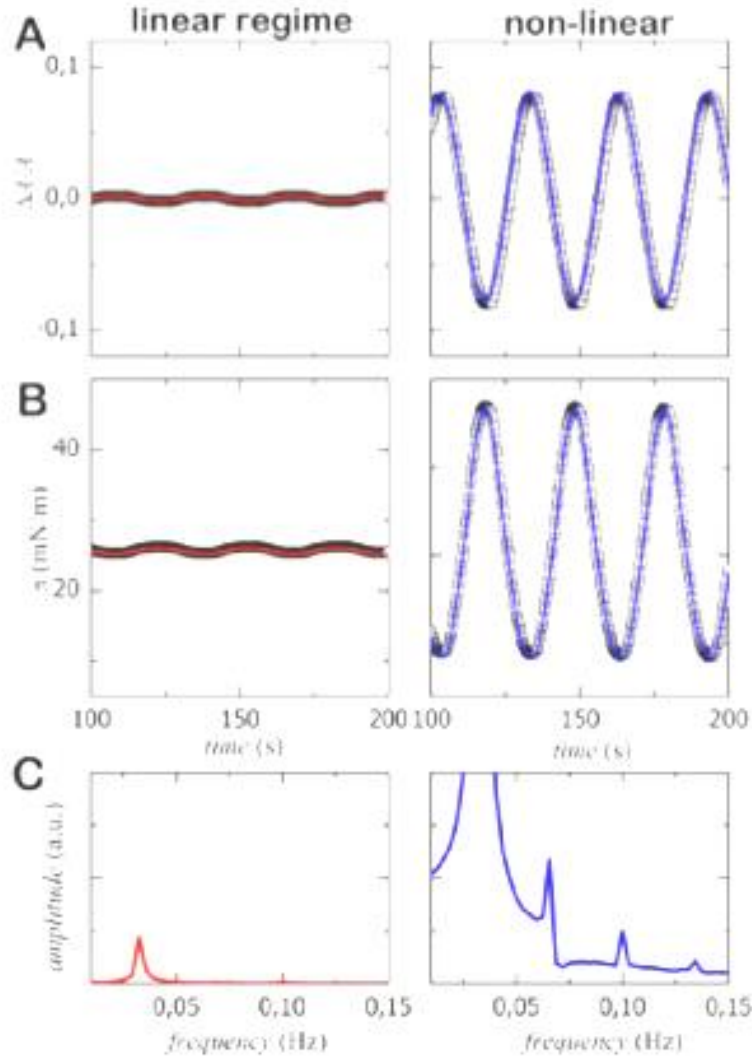


Figura 7.3. **A)** Deformación experimental $u = (A - A_0)/A_0$ y **B)** trazas temporales del esfuerzo grabadas en la compresión oscilatoria de monocapas de eggCer a una frecuencia de 0.033 Hz (período de 30s) en $\pi = 25$ mN/m en el régimen lineal (0.005 amplitud de deformación; paneles de la izquierda) y no lineal (0.08 amplitud; paneles de la derecha). **C)** transformación de Fourier de las trazas temporales del esfuerzo.

En la figura 7.3B se muestran las respuestas del esfuerzo y en la figura 7.3C los correspondientes espectros de Fourier. A pequeñas deformaciones, la respuesta de la presión superficial se puede ajustar con precisión a una sola senoide (Ec. 6.6) con una frecuencia ω idéntica a la frecuencia de excitación (figura 7.3B, panel izquierdo). Esto se confirma observando la transformada de Fourier

de la función del esfuerzo frente al tiempo (figura 7.3C, izquierda). Los paneles de la derecha en la Figura 7.3 muestran la típica respuesta no lineal del esfuerzo que se observa para deformaciones de gran amplitud (figura 7.3 A y B). En ese caso, el espectro de Fourier muestra varios armónicos de la respuesta fundamental (figura 7.3C, panel de la derecha).

La Figura 7.4A muestra las gráficas de esfuerzo-deformación medidas a diferentes presiones superficiales y con la misma frecuencia (0.033 Hz, el período de 30s). A bajas presiones ($\Pi \approx 8$ mN/m) se observa un régimen lineal Hookeano y a presiones superficiales más altas ($\Pi \geq 20$ mN/m), por encima del umbral de deformación crítica $u_c \approx 0,02$, las curvas de esfuerzo-deformación se desvían claramente de la conducta lineal asintótica: $\sigma < \sigma_{lin} = E'u$. Por ello se obtiene un módulo efectivo más pequeño, lo que sugiere un comportamiento de "reblandcimiento" del esfuerzo. En este régimen, las transformadas de Fourier revelaron igualmente la presencia de armónicos más altos, confirmado así la presencia de efectos no lineales [115]. Por encima de la u_c , se observó un plateau plástico alrededor de $\Pi = 27$ mN/m. A esta presión superficial se observó la presencia de efectos de histéresis durante los diferentes ciclos de compresión-expansión realizados a una velocidad de compresión de 5 cm²/min. Los ciclos se pueden observar en la figura 7.4B.

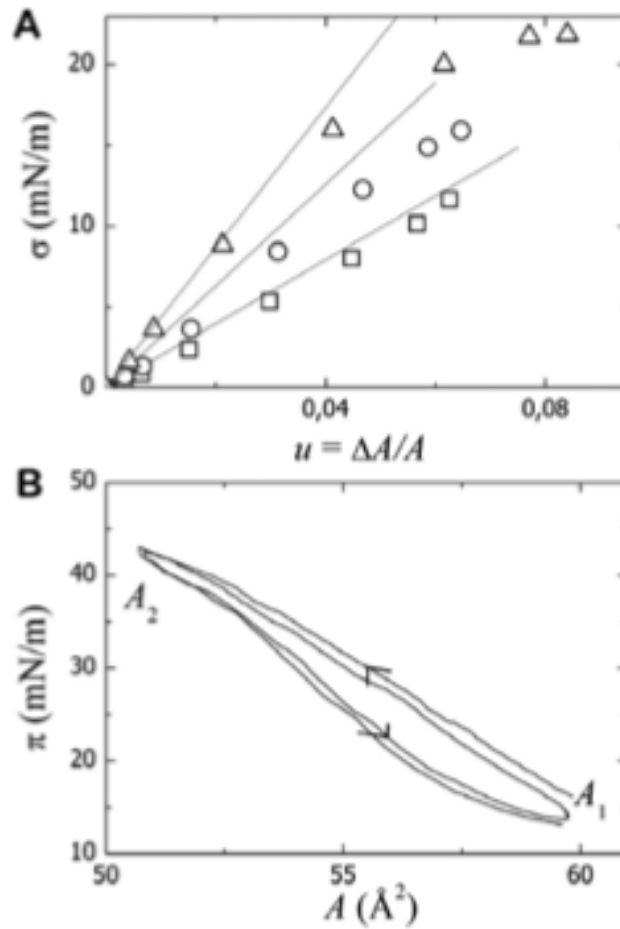


Figura 7.4. A) Curvas de esfuerzo-deformación para compresiones oscilatorias en monocapas de eggCer a diferentes presiones ($\pi = 8$ mN/m (\square); 20 mN/m (\circ); 27 mN/m (Δ)). La frecuencia de las oscilaciones es 0.033 Hz; la amplitud $u = 0,01$. Las líneas rectas representan el comportamiento lineal asintótico $\sigma_0 = Eu_0$, que definen el módulo de equilibrio E en la figura 7.1B. **B)** Ciclos de compresión-expansión para ceramida de huevo (en $\pi = 27$ mN/m). Es claramente visible un bucle de histéresis reversible (tasa de compresión 5 cm^2/min).

Los experimentos de reología de compresión oscilatoria permiten también el estudio de la dependencia del módulo viscoelástico con la frecuencia. En estos experimentos, a fin de mantener una respuesta lineal, la amplitud de deformación se fijó a 0,5% ($u = 0,005 \ll u_c$). La Figura 7.5A muestra la dependencia del módulo elástico de compresión lineal (E') con la frecuencia, medido a diferentes presiones. A bajas presiones ($\pi < 20$ mN/m), el módulo de

compresión es independiente de la frecuencia, con valores compatibles con el módulo de compresión $E_{||fast}$ medido con una placa de Wilhelmy paralela a las barreras y a una velocidad de compresión alta (100 cm²/min), como se muestra en la Figura 7.6. Esto sugiere que el tiempo de relajación es más largo que $(du/dt)^{-1}$ para esta velocidad, es decir, más de 10 min aproximadamente. La compresión oscilatoria es, en efecto bastante rápida (un periodo 100 s para una frecuencia de 0,01 Hz).

Además, se observa una débil, pero sistemática, disminución del módulo de compresión en función de la frecuencia, a la presión más alta estudiada, $\pi > 30$ mN/m, incluso para los valores bajos de u utilizados ($\ll u_C$). La figura 7.5B muestra los valores experimentales del módulo de pérdidas obtenido para los mismos estados de monocapa presentados en la figura 7.5A. Los valores del módulo de elasticidad fueron significativamente mayores que los del módulo de pérdidas ($E' \gg E''$), un comportamiento típico de los sólidos elásticos, que se caracterizan por pequeñas pérdidas por fricción. De manera similar a E' , no se observó ninguna dependencia de E'' con la frecuencia para bajas presiones. Como era de esperar, los valores absolutos de E'' aumentaron con la presión superficial, llegando a un valor relativamente alto para la presión explorada más alta ($E'' \approx 75$ mN/m en $\Pi \approx 30$ mN/m). Sin embargo, a esta alta presión, se observó que el módulo de pérdidas disminuía al aumentar la frecuencia de deformación, un efecto de fluidificación que concuerda con la dinámica de "reblandecimiento" observada en E' (véase la figura 7.5A). La disminución de E' con el aumento de ω es anómalo, ya que las relaciones de causalidad lineal implica que E' debe aumentar, mientras que E'' disminuye. Sin embargo, aunque a bajas frecuencias la monocapa responde linealmente, es posible que entre en un régimen no lineal cuando aumenta ω (u pequeña, pero du/dt grande); en este caso ya no se espera un aumento de E' con ω .

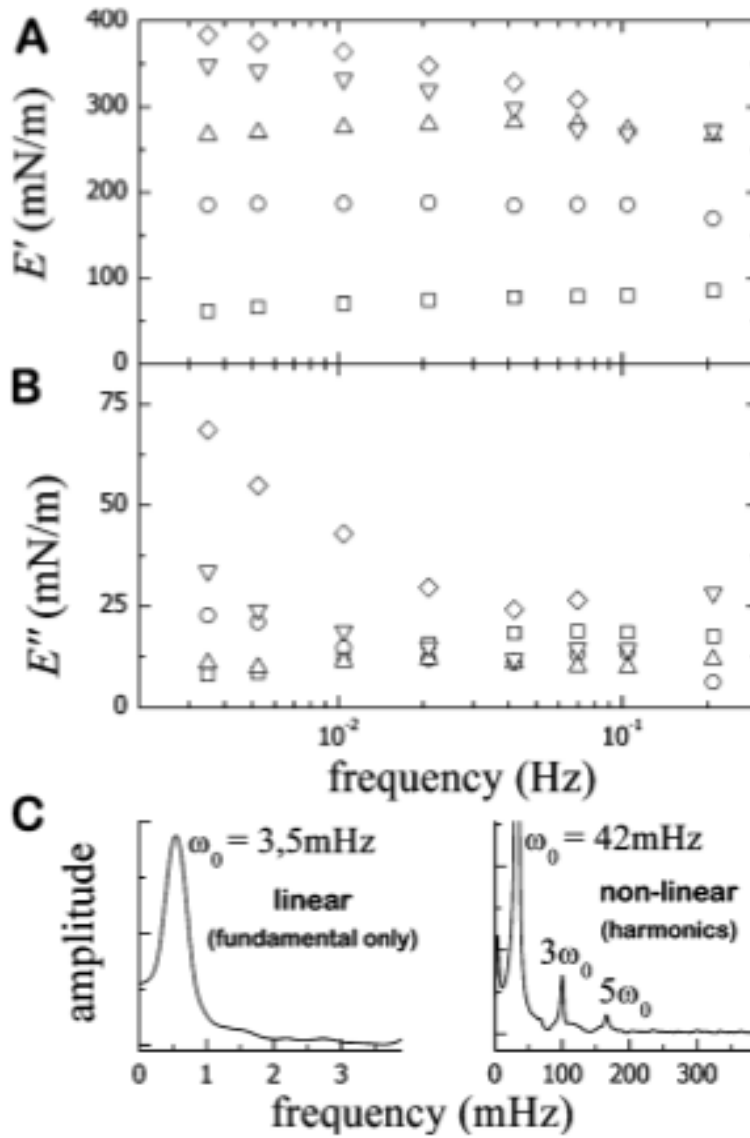


Figura 7.5. **A)** Dependencia del módulo de compresión E' con la frecuencia, obtenido a partir de experimentos de compresión oscilatoria ($u = 0,01$) a diferentes presiones (área molecular entre paréntesis): $\pi = 5$ mN/m (55 \AA^2) (\square); 10 mN/m (50 \AA^2) (\circ); 15 mN/m (48 \AA^2) (Δ); 20 mN/m (48 \AA^2) (∇); 30 mN/m (46 \AA^2) (\diamond). **B)** Dependencia del módulo de pérdidas E'' con la frecuencia medido a las mismas presiones que en (A). **C)** Espectros de Fourier del esfuerzo para una monocapa densa ($\pi = 30$ mN/m) a baja ($\omega_0 = 3,5$ MHz; panel izquierdo) y alta frecuencia ($\omega_0 = 42$ MHz; panel derecho).

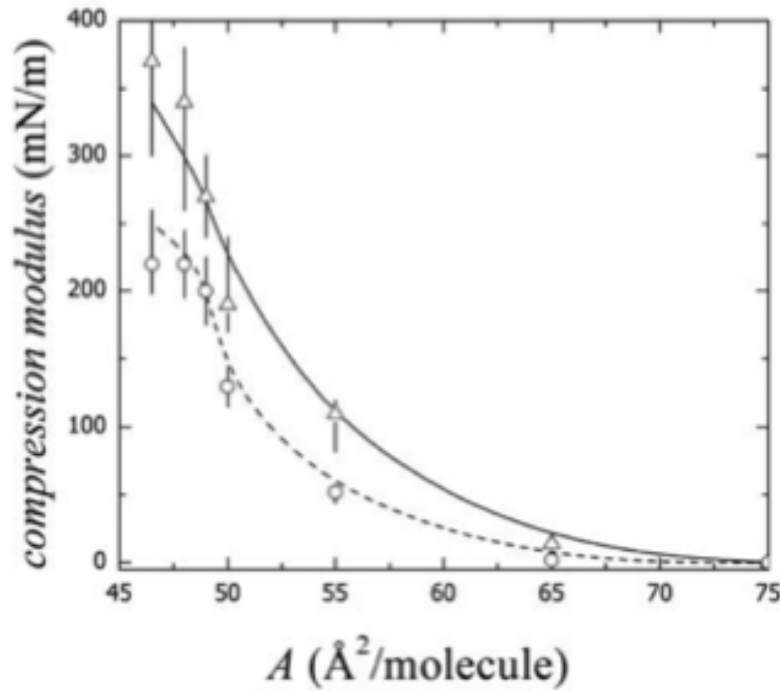


Figura 7.6. Dependencia del módulo de compresión con el área superficial. Las líneas representan los valores de $E_{||}$ obtenidos en los experimentos de compresión continua realizados a tasas de compresión altas (1 cm²/min: línea continua) y bajas (100 cm²/min: línea discontinua). Los símbolos corresponden a los datos medidos en estados discretos alcanzados por deposición sucesiva: (○) módulo isotrópico, K ; (Δ) módulo de compresión medido en experimentos de barrera oscilatoria, E' (0.033 Hz, $u = 0,01$).

De hecho, esto es exactamente lo que observamos en la transformada de Fourier de las respuestas del esfuerzo (ver Figura 7.5 C): se observan armónicos no lineales a altas velocidades de deformación (panel derecho), mientras que están ausentes a bajas tasas de deformación (a la izquierda del panel de la figura 7.5C). Hay que tener en cuenta que este régimen no lineal se observa por encima de valores de du/dt relativamente bajos ($\approx 10^{-3} \text{ s}^{-1}$), en consonancia con el comportamiento de las isothermas de compresión cuando se aumenta la velocidad de compresión (§ 7.1).

7.2 Reología de cizalla de monocapas de ceramidas

El carácter sólido de las monocapas de ceramida se demuestra mejor en experimentos mecánicos en donde se estudia la respuesta a la cizalla: un fluido tiene un módulo de compresión finito pero un módulo de cizallamiento cero [48]. En lo siguiente, el estado termodinámico de las monocapas de ceramidas se caracterizará por el parámetro del área por molécula. Esto es debido a que es difícil conseguir estados de presiones similares y no podemos medir la presión superficial en la cubeta del reómetro de cizalla. Además, como ya hemos explicado, el estado de presión depende del procedimiento de preparación de monocapa.

La Figura 7.7A muestra las curvas de esfuerzo-deformación obtenidas con reología de cizalla oscilatoria en monocapas de ceramida a diferentes concentraciones superficiales y a una frecuencia constante (1 Hz).

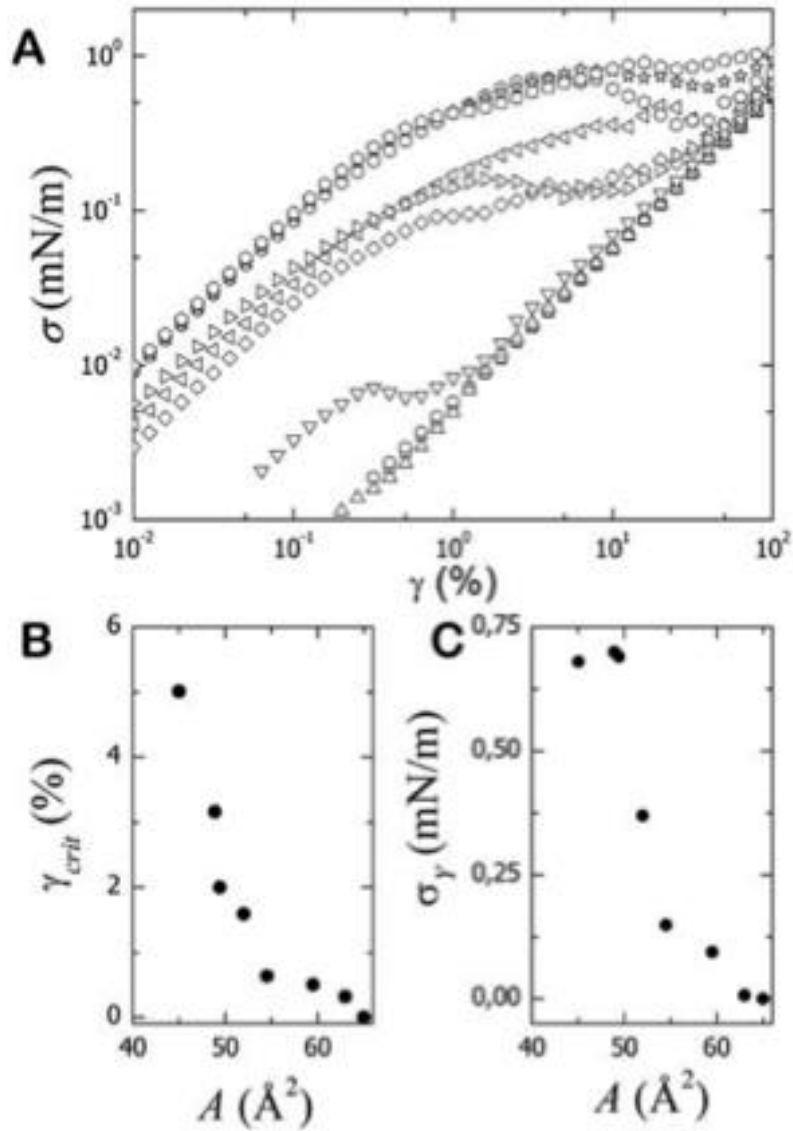


Figure 7.7. A) Curvas de esfuerzo-deformación de monocapas de Langmuir de ceramida de huevo a diferentes estados de empaquetamiento y a una frecuencia de 1 Hz; Áreas Moleculares: (\square) 90, (\circ) 75, (\triangle) 65, (∇) 63, (\diamond) 60, (\triangleleft) 54.5, (\triangleright) 52, (\boxplus) 49.5 ($*$) 49, and (\boxminus) 45 \AA^2 . **B, C)** Dependencia de los límites de elasticidad que caracteriza el plateau en función del por molécula: (B) límite de deformación; (C) límite de esfuerzo.

A bajas concentraciones ($A > 65 \text{ \AA}^2$), las gráficas de esfuerzo-deformación son lineales, la monocapa se comporta similar a un fluido: $\sigma = G'' \gamma$ y $G' = 0$. A concentraciones algo mayores ($A < 65 \text{ \AA}^2$), la respuesta del esfuerzo pone de manifiesto un módulo de

cizalla finito característico de una qfase sólida ($G' > 0$) [116, 117, 118]. Así, el esfuerzo se caracteriza por un régimen lineal inicial que termina en una deformación crítica (límite elástico) (figura 7.7A), que es seguida por un plateau plástico. La deformación crítica (figura 7.7B) y el punto de fluencia (figura 7.7C) aumentan progresivamente cuando la concentración superficial disminuye: cuanto más densa la monocapa, mayor es el esfuerzo límite y la deformación crítica. Este comportamiento es típico en materiales sólidos tridimensionales. Las deformaciones críticas encontradas en experimentos de cizalla son comparables a las encontradas en reología compresión (u_c) para concentraciones superficiales comparables. Además, los efectos no lineales fueron detectados a deformaciones tan bajas como $\gamma_c \approx 0.1\%$. Por ello, para permanecer en el régimen lineal en las siguientes secciones, los estudios de la dependencia de la frecuencia se realizaron con una amplitud de deformación de $\gamma = 0.05\%$ ($= 5 \times 10^{-4} < \gamma_c$).

La figura 7.8 muestra la dependencia del módulo viscoelástico de cizalla con la frecuencia.

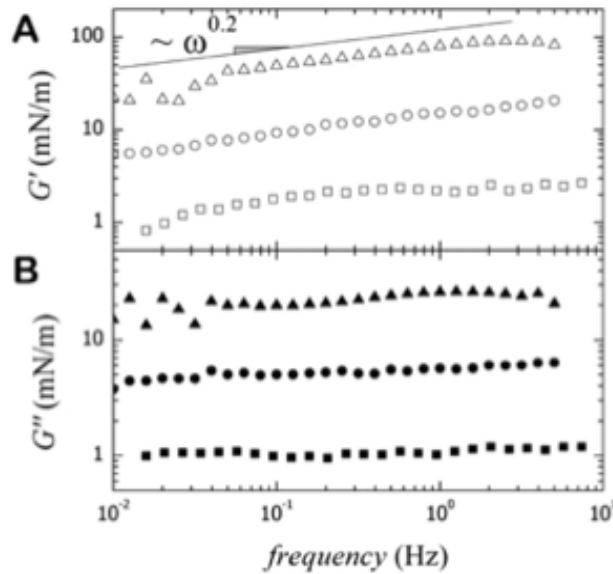


Figura 7.8. La dependencia del módulo de cizalla con la frecuencia obtenido a partir de experimentos de cizalla oscilatoria con $\gamma = 5 \times 10^{-4}$ (0,05%) a diferentes estados ($A = 70$ (\square), 60 (\circ), y 50 \AA^2 (Δ)). **A)** El módulo de almacenamiento, G' , **B)** el módulo de pérdida, G'' . La línea representa un comportamiento de ley de potencia débil, típico de materiales sólidos, $\sim \omega^{0.2}$.

Los valores del módulo de cizalla mostrados en la figura 7.8A alcanzan valores muy altos; G' va desde 1 hasta 100 mN/m, como se esperaba para monocapas sólidas [48]. Las monocapas de ceramida se comportan por lo tanto como sólidos relativamente duros, con módulos equivalentes bulk G'/d comparables a sólidos tridimensionales (siendo d el espesor de la monocapa: con $d \approx 1$ nm, G'_{3D} es de hasta 0,1 GPa, del orden de los valores encontrados para sólidos blandos). Los datos en la figura 7.8A muestran la dependencia a una ley de potencia caracterizada por un exponente débil, $G' \sim \omega^{0.2}$, también típico de los sólidos blandos [119]. La figura 7.8B muestra la dependencia con la frecuencia del módulo de pérdidas de cizallamiento, en las mismas condiciones que en la figura 7.8A. Los módulos de pérdidas son prácticamente constantes, independientemente de la frecuencia de deformación, un comportamiento también típico de sólidos [119]. Con el fin de estudiar los efectos no lineales, la viscoelasticidad de cizallamiento se determinó como una función de la deformación aplicada a una frecuencia constante de 1 Hz. La figura 7.9A muestra los valores medidos para el módulo de almacenamiento en cizalla, que disminuyen sistemáticamente con el aumento de la velocidad de deformación, una prueba clara del reblandecimiento de la monocapa: cuanto más densa es la monocapa, más significativo es el efecto de reblandecimiento. G' alcanza valores cercanos a cero para grandes deformaciones, compatible con el comportamiento de un fluido, revelando características de "fundido" de cizalla. La figura 7.9B muestra que el G'' alcanza igualmente valores cercanos a cero para estas amplitudes de deformación. Estos resultados podrían tener importantes implicaciones biológicas en el contexto de las biomembranas reales, como veremos en la discusión.

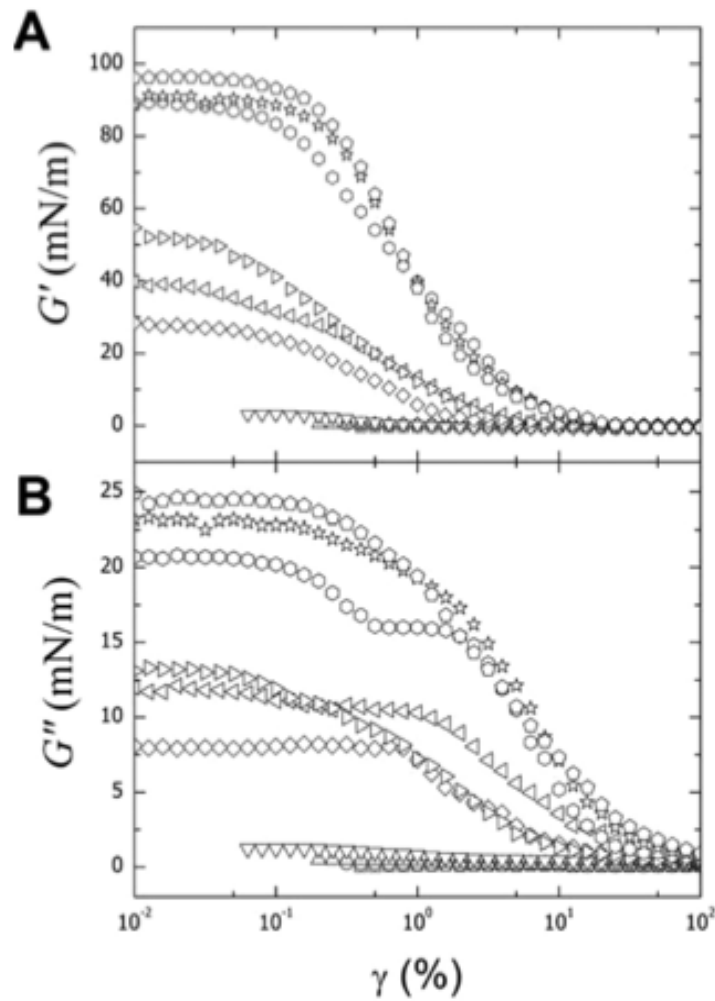


Figure 7.9. Dependencia no lineal con la deformación de **A)** Módulo de cizalla G' y **B)** módulo de pérdida G'' de monocapas de eggCer en diferentes estados de empaquetamiento (símbolos como en la Figura 7.6; la frecuencia se fijó a 1 Hz).

7.3. Transiciones termomecánicas de monocapas de ceramidas

Rheología de cizalla oscilatoria

Acabamos de ver que el carácter sólido de las capas bidimensionales de ceramida de huevo se puede obtener mediante experimentos mecánicos en monocapas de Langmuir en los que se monitoriza la respuesta a una deformación de cizalla, siendo el módulo de cizalla

un indicador inequívoco del carácter sólido o fluido de un sistema. Así, los sólidos soportan compresión y cizalla mientras que los líquidos no presentan resistencia bajo cizalladura, i.e. están sujetos a flujo. Como ya hemos demostrado en el apartado anterior, las ceramidas de huevo muestran un carácter sólido [17]. En este apartado hemos estudiado la dependencia con la temperatura de la respuesta de cizalla. La figura 7.10 muestra los valores medidos de los módulos de almacenamiento G' y de pérdidas G'' en función de la temperatura durante un ciclo de calentamiento y a diferentes estados de empaquetamiento. A bajas temperaturas, ambos módulos presentaban valores mayores que cero, con $G' > G''$, indicativo de monocapas sólidas como ya hemos mencionado. Hasta la temperatura $T_s \approx 20^\circ\text{C}$, los valores de los dos módulos permanecen constantes, G'_0 y G''_0 cuyo valor depende de la concentración superficial del lípido (ver figura interna de la figura 7.10A), un signo claramente distintivo de un estado sólido de la monocapa. Cuando se calienta el sistema por encima de T_s , la fase sólida penetra progresivamente en una fase intermedia donde los dos módulos son todavía mayores que cero, pero disminuyen (quasi-linealmente con la temperatura) hasta una temperatura T_f , la temperatura de fusión, donde G' se hace cero. Por encima de T_f , las monocapas de ceramida se reblandecen ($G' = 0$) pero conservan un valor finito de la fluidez, caracterizado por valores distintos de cero del módulo de pérdidas ($G'' > 0$). Mientras que T_s es independiente del grado de empaquetamiento de la monocapa, T_f depende linealmente con la concentración lipídica (figura 7.10A).

Estos datos apuntan a la existencia de tres fases diferentes, encontradas en el rango de temperaturas estudiadas: una fase sólida hasta 20°C , una fase gel desde que aparece en el rango comprendido entre los 20 a los 45°C y finalmente una fase fluida por encima de los 45°C . Para profundizar más en esta atribución de fases termodinámicas, el espesor molecular de las monocapas se puede determinar a lo largo del ciclo de calentamiento en condiciones isocóricas (ver figura 7.11). El estado sólido de las monocapas de ceramidas está caracterizado por un espesor de 1.95 nm , un valor compatible con el encontrado en otras ceramidas sintéticas [99]. El reblandecimiento producido por el aumento de temperatura, se acompaña de una disminución progresiva del espesor de la

monocapa, alcanzando un valor mínimo de 1.75 nm, cuando se penetra en la fase fluida.

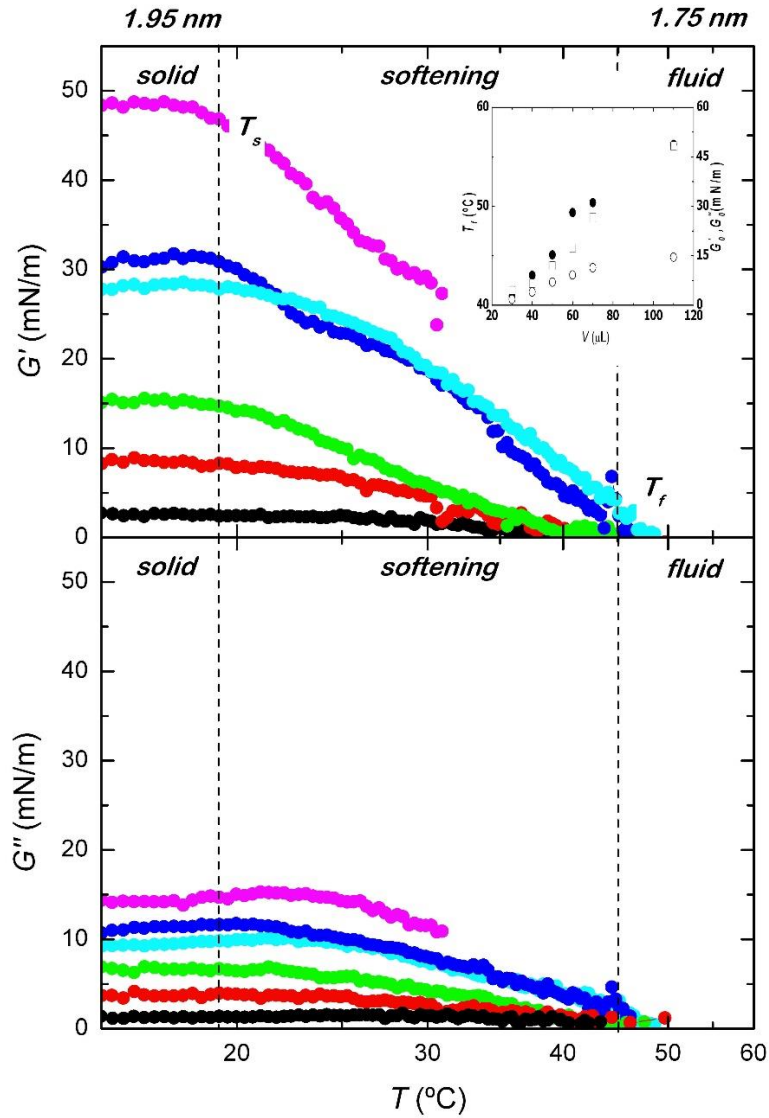


Figura 7.10. Módulos viscoelásticos de cizalla, G' y G'' , en función de la temperatura a diferentes concentraciones superficiales durante un ciclo de calentamiento. **Recuadro interno:** G'_0 , G''_0 y temperatura de fusión (T_f) en función del volumen añadido de muestra

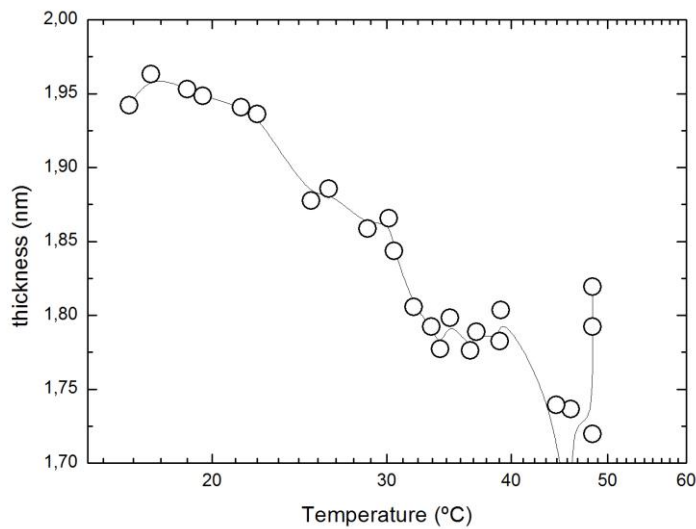


Figura 7.11. Espesor de la monocapa en función de la temperatura

De manera análoga, la respuesta termomecánica de monocapas de ceramidas de huevo puede ser estudiada mediante un ciclo de enfriamiento. Para ello, se debe comenzar con una monocapa en estado fluido en un estado de empaquetamiento medio. En estos experimentos, el módulo de cizalla aumenta desde un valor cero encontrado a altas temperaturas ($G' = 0$ at $T > 60^\circ\text{C}$) hasta un valor finito (distinto de cero) por debajo de la temperatura de congelamiento ca. 52°C . El valor de esta temperatura está por debajo de la temperatura de fusión ($T_f \sim 56^\circ\text{C}$) (figura 7.12), lo que sugiere la presencia de efectos de subenfriamiento en las películas monomoleculares. Además, a menores temperaturas ($T < 40^\circ\text{C}$), los valores del módulo de almacenamiento son menores que los medidos en los ciclos de calentamiento. Así, los valores de plateau, correspondientes a la fase sólida son significativamente más pequeños que cuando la monocapa se prepara en un estado congelado. Cuando los experimentos se realizan a diferentes velocidades de enfriamiento, encontramos que las temperaturas de enfriamiento así como los valores de plateau son menores a mayores velocidades de enfriamiento, un hecho dinámico que vuelve a señalar la existencia de efectos de subenfriamiento durante el proceso de congelación (ver cuadro interno de la figura 7.12). El mecanismo que subyace al subenfriamiento de ceramidas, podría estar relacionado con efectos de nucleación. De hecho, la

condensación a una fase sólida requiere sobrepasar una barrera de energía, la cual podría ser suficiente para retener al sistema con propiedades propias de estados blandos encontrados a temperaturas superiores. Finalmente se puede decir que un comportamiento similar se ha encontrado para el módulo de pérdidas., el cual alcanza valores tan pequeños como 2mN/m cuando se enfría la monocapa a máxima velocidad.

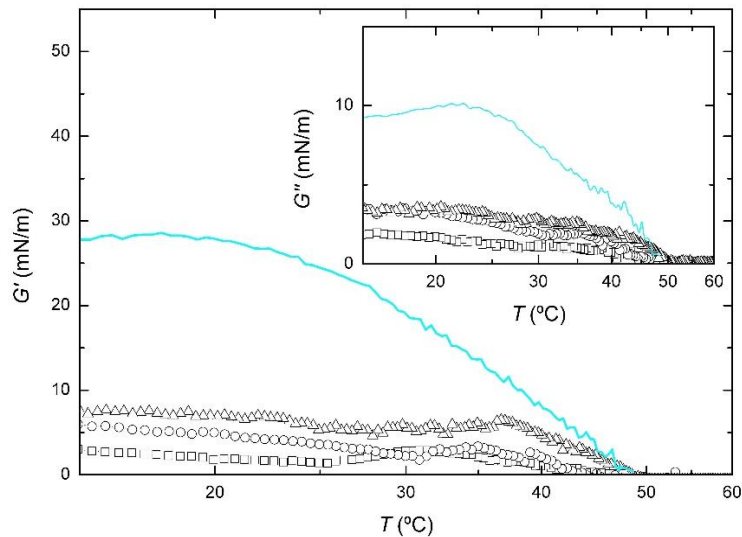


Figura 7.12. G' en función de la temperatura durante un ciclo de enfriamiento a diferentes velocidades de enfriamiento. La línea continua representa la función $G'(T)$ para un mismo estado de presión durante un ciclo de calentamiento. **Cuadro interno:** G'' en función de la temperatura durante un ciclo de enfriamiento a diferentes velocidades de enfriamiento. La línea continua representa la función $G'(T)$ para un mismo estado de presión durante un ciclo de calentamiento.

Diagrama de fases

Para identificar el estado termodinámico con estos tres estados mecánicos y poderles asignarles una fase lipídica bien establecida, se ha estudiado el diagrama de fases, presión temperatura, (π - T). Como referencia, se ha usado el diagrama de fases detallado que se ha publicado recientemente para monocapas de palmitoil-ceramida sintética. En este caso, hemos combinado microscopía de ángulo Brewster con una monitorización simultánea de isothermas de compresión e isobaras en monocapas de Langmuir. Los resultados

permiten construir un diagrama de fases muy similar para la ceramida de huevo. La figura 7.13 muestra las isothermas Π -A de monocapas de ceramida de huevo a diferentes temperaturas. Por debajo de 37°C, las isothermas son continuas y diferenciables hasta el colapso. Además, no se detectan transiciones de fase, pues no se observan discontinuidades a lo largo del camino de compresión. De manera general, para áreas moleculares por encima de los 65 Å², las isothermas π -A tienen una presión superficial cero, y a mayor compresión, la presión lateral aumenta abruptamente hasta el colapso, dando lugar a isothermas de tipo condensado cuasi atómicas, caracterizadas por un área extrapolada límite $A_0 (\Pi \rightarrow 0) = 70A_2$. Sin embargo, a temperaturas mayores, ($T > 37^\circ\text{C}$), se observa un comportamiento diferente. Las isothermas se vuelven más expandidas, y se detecta una transición de Segundo orden a presiones cercanas a 30 mN/m. A 52°C, se detecta una segunda transición de segundo orden pero a bajas presiones laterales ($\sim 5 \text{ mN/m}$).

Para caracterizar cuantitativamente los diferentes estados encontrados en las isothermas, los módulos de compresión se calcularon mediante la derivada numérica de las isothermas π -A experimentales, como ya hemos señalada anteriormente:

$$E = - \frac{\partial \Pi}{\partial A} A \quad (\text{figura interna de la figura 7.13}).$$

Por debajo de 37°C, el módulo de compresibilidad muestra un máximo a presiones en torno a 25-30 mN/m, la presión lateral equivalente a un empaquetamiento lipídico biológicamente relevante en forma de bicapa [113]. Las ceramidas de huevo presentan por tanto una compresibilidad reducida, ya que los valores de E están entorno a unos cientos de mN/m. Sin embargo, una mayor compresibilidad aparece cuando las monocapas son comprimidas más, ya que ε disminuye cuando se alcanza el colapso de la monocapa y aparecen estructuras tridimensionales. A temperaturas mayores, el módulo elástico disminuye hasta $\sim 100 \text{ mN/m}$, un valor típico de fases fluidas [120,121]. Finalmente, para la temperatura mayor explorada, 52°C, se encuentra un segundo máximo a 40 mN/m de presión lateral, que corresponde a una transición de menor empaquetamiento. El valor absoluto del segundo máximo fue mucho menor ($\varepsilon_2 \sim 50 \text{ mN/m}$) que el valor observado en el pico principal. Por lo tanto, por encima de la T_f , las ceramidas de huevo se caracterizan por un módulo de cizalla igual a cero pero por un

módulo de compresión finito (distinto de cero), reforzando la transición de sólido a fluido detectada a la temperatura T_f .

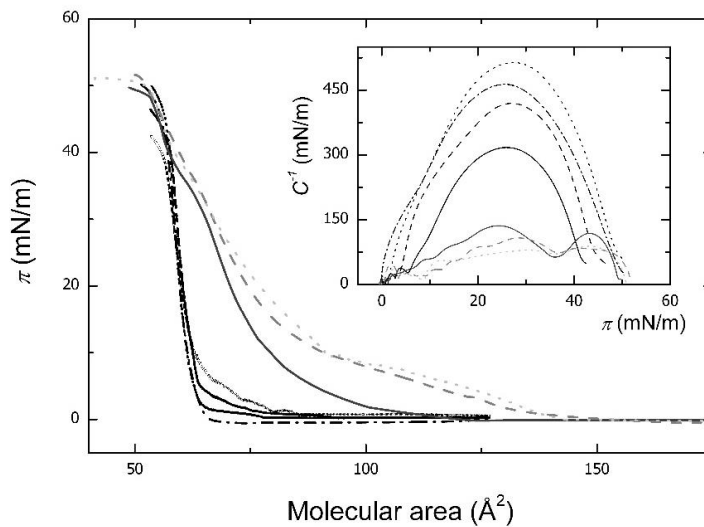


Figura 7.13. Isotermas de compresión Π -A de egg-ceramida a diferentes temperaturas. Cuadro interno: Módulo de compresión calculado mediante la derivada de la isoterma correspondiente.

Una información complementaria a las isotermas de compresión puede obtenerse del análisis topográfico de las monocapas de Langmuir. La figura 7.14 muestra las diferentes topografías superficiales encontradas y que son representativas de las diferentes fases lipídicas. A bajas temperaturas y bajas presiones, se observan un fase sólido + gas (figura 7.14a). Las balsas lipídicas tienen frecuentemente bordes rectilíneos, que es típico de materiales sólidos. Comprimiendo más, una fase sólida homogénea se produce mediante la fusión de las plataformas lipídicas. Esta transición de S+G a S se detecta a más bajas presiones cuando se comprime la monocapa a mayores temperaturas. Desde el estado sólido, un aumento de temperatura produce una disminución de la reflectancia (figura 7.14b), indicando una transición de sólido a líquido condensado (LC); ésta fase caracterizada por un menor espesor de la monocapa. LA transición S a LC se encontró a temperatura ambiente y no depende del empaquetamiento lipídico de la monocapa. A temperaturas mayores de 37°C se observa una coexistencia de fases LC+LE, incluso a bajas presiones laterales (Figura 7.14c). Esta fase se observa como una fase oscura decorada con dominios LC más

brillantes. A mayor compresión, los dominios LC, fusionan entre ellos para formar una fase homogénea LC. Cuanto mayor es la temperatura, mayor es la presión de esta transición. Esta presión se determinó de manera precisa mediante los máximos del módulo de elasticidad mostrados en la figura 7.13. Además, también se detectó una transición LE a LE+LC a 52°C y a muy bajas presiones laterales. La fase LE (figura 7.14d) se caracteriza por un módulo de compresibilidad bajo ~ 50 mN/m, como se muestra en la figura 7.13. Finalmente, una superficie quebrada surge cuando las monocapas de ceramida alcanzan la zona de colapso (figure 7.14e). Las regiones con más grosor, caracterizadas por una intensidad muy brillante, se mostraron como ondas superficiales que incrementan su grosor cuando se las monocapas se someten a mayor compresión. Todos los resultados expuestos se resumen en el diagrama de fases presión – temperatura obtenido para monocapas de ceramida de huevo y que se muestra en la figura 7.14f.

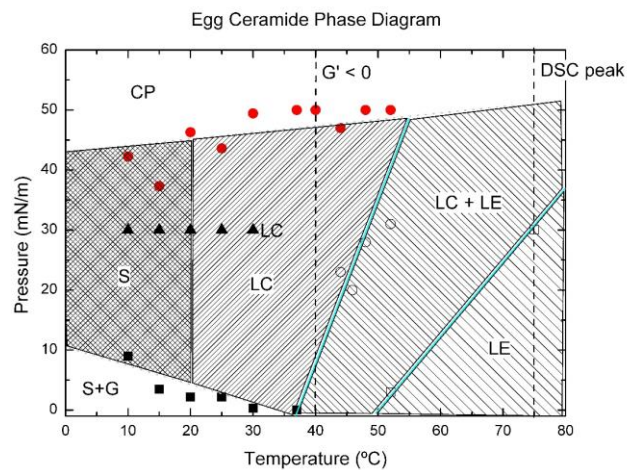
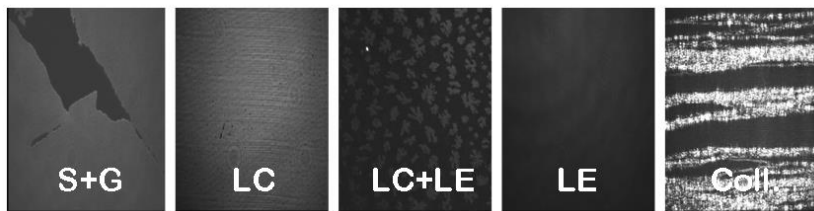


Figura 7.14 A) Topografías de monocapas de ceramida de huevo en las diferentes fases termodinámicas. B) Diagrama de fases P - T para ceramida de huevo.

Calorimetría diferencial de barrido

Debido a los efectos de evaporación/condensación, no se pueden hacer isotermas de compresión, así como imágenes topográficas a altas temperaturas ($T > 55^{\circ}\text{C}$). Sin embargo se pueden realizar experimentos de calorimetría sobre multicapas de ceramidas de huevo, con el objetivo de profundizar en el comportamiento termodinámico de estas moléculas a mayores. La figura 6 muestra el termograma obtenido para ceramida de huevo durante un ciclo de calentamiento-enfriamiento. En él se muestran dos transiciones termotrópicas diferentes. Durante el proceso de calentamiento, se detecta una transición endotérmica ancha a $\sim 75^{\circ}\text{C}$. De manera interesante, la transición principal se acompaña de un pico endotérmico lateral a una temperatura menor. Para determinar con precisión las dos temperaturas de transición la señal DSC se descompuso en varias componentes. Como la curva no se ajusta a dos únicas componentes, el mejor ajuste requiere de tres componentes centrados en 45.7 , 67.2 y 74.4°C ($\Delta H = C_p \cdot \Delta T = 4$, 24.4 and 14.9 kcal/mol respectivamente). El proceso de enfriamiento (figura interna en figure 7.15) hace aparecer ambos picos exotérmicos a los que sigue un pico endotérmico a bajas temperaturas. Como en el proceso de calentamiento, la curva DSC fue analizada en términos de tres componentes, localizados en temperaturas de transición similares a los encontrados en el proceso de calentamiento: 44.7 , 65.3 y 74.5°C ($\Delta H = 4$, 24 . y 15 kcal/mol respectivamente).

Estos resultados son compatibles con el primer termograma 2publicado para C16-Ceramida [122] En aquellos experimentos, la ceramida C16 mostraba una transición endotérmica a $\sim 90^{\circ}\text{C}$ y un pico exotérmico ancho a $\sim 60^{\circ}\text{C}$. Mediante experimentos de difracción de rayos x, un diagrama de fases para suspensiones multilamelares se propuso: una fase gel metaestable se transforma en una fase estable más fina 60°C y que finalmente sufre una fusión de sus cadenas a $\sim 90^{\circ}\text{C}$. En nuestro caso, La fase con las cadenas totalmente fundidas ocurre a temperaturas menores, $\sim 75^{\circ}\text{C}$, debido probablemente a la composición heterogénea de la ceramida de huevo. Sorprendentemente, una nueva transición se ha detectado a temperatura menor ($\sim 45^{\circ}\text{C}$). Esta temperatura podría corresponder a la transición mecánica sólido-fluido y a la transición termodinámica LC a LC+LE .

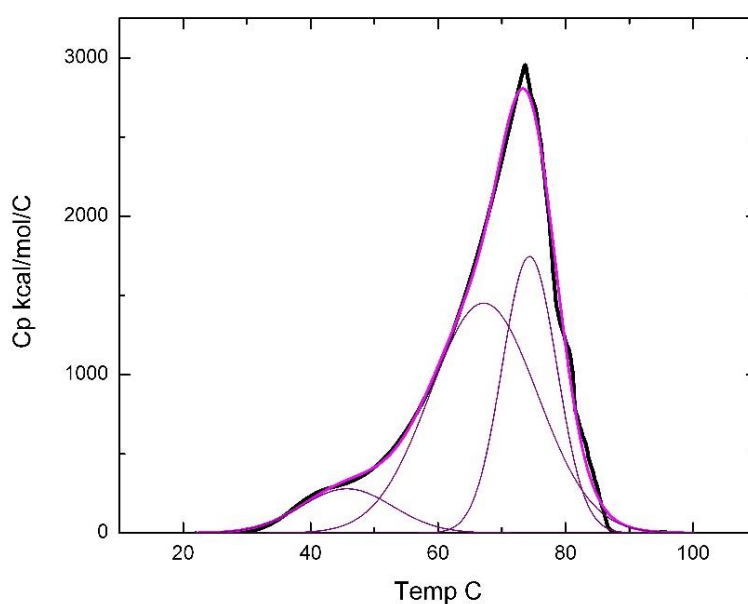


Figura 7.15. Termograma de ceramida de huevo.

7.4. Reología de compresión de monocapas mixtas de ceramida/esfingomielina

Isotermas

Hasta ahora hemos presentado los resultados obtenidos para monocapas de un solo componente, i.e la ceramida de huevo. A partir de esta sección se muestra un estudio de las diferencias de comportamiento entre monocapas de ceramidas de huevo y sus mezclas con su precursor: la esfingomielina de huevo. Para ello, se vuelven a mostrar ciertos resultados ya discutidos en secciones precedentes, en aras de una mayor claridad de exposición de resultados, que cobran su sentido pleno a partir de una comparación entre las propiedades mecánicas de las dos especies involucradas.

La figura 7.16A muestra los valores experimentales de presión superficial vs área molecular (Π -A) de la isoterma de eggCer, medida a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Para áreas moleculares por encima de 75 \AA^2 , la isoterma de Π -A se mantuvo a una presión cercana a cero que es compatible con un estado diluido. Al comprimir por debajo de 75 \AA^2 , la presión lateral aumenta hasta un estado de pseudo-plateau a una presión de $\sim 5 \text{ mN/m}$. Luego, en la

zona cercana a 50 \AA^2 , la isoterma aumenta repentinamente hasta entrar en la zona de colapso a $A \approx 40 \text{ \AA}^2$, caracterizado por una presión constante ($\sim 49 \text{ mN/m}$). Generalmente, la isoterma muestra una forma condensada caracterizada por una pendiente alta, típica de fases sólidas [123]. Esta isoterma es cualitativamente similar a la obtenida recientemente por Busto et al. [110] para ceramida C16 sintética.

Para obtener más información acerca de la estructura de las monocapas de eggCer, se capturaron imágenes de BAM simultáneamente a lo largo de un ciclo de compresión. La figura 7.16a-h muestra la evolución de la textura de las monocapas para los estados progresivos de mayor presión superficial. En el estado diluido ($\pi < 5 \text{ mN/m}$), el sistema es heterogéneo: se obtuvieron regiones de estado gaseoso (zonas oscuras) entre plataformas de ceramida (zonas brillantes).

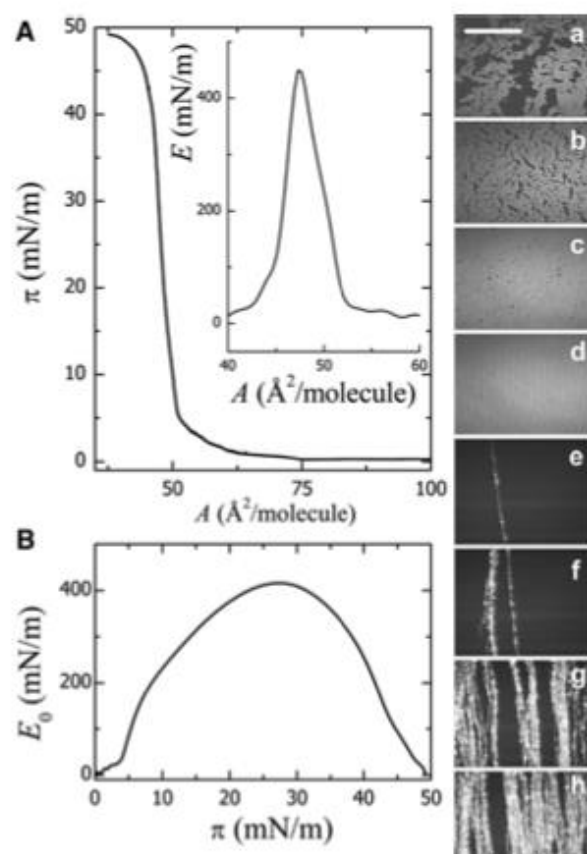


Figura 7.16 A) Presión superficial de la isoterma π - A de monocapa de eggCer realizada a una velocidad de compresión de $5 \text{ cm}^2/\text{min}$. (Recuadro

interno) Módulo de elasticidad E de eggCer representado en función del área molecular media. **B)** Módulo de elasticidad E de eggCer representado en función de la presión superficial. **Imágenes a-h)** micrografías de monocapas de eggCer realizadas en BAM (la barra de escala corresponde a 100 nm). Las imágenes representan estados de monocapa a lo largo de una isoterma de compresión continua a 20 °C. a) 0,3 mN/m, b) 0,6 mN/m, c) 2 mN/m, d) 5 mN/m, y e-h) la secuencia de imágenes que muestra la topografía superficial de las monocapas de eggCer durante el colapso. Las regiones brillantes corresponden a zonas de la superficie más gruesas que emergen de la monocapa de ceramida.

A esta temperatura, los parches de lípido no mostraron bordes planos, lo que sugiere una disposición molecular típica de sólidos amorfos (glassylike). A mayor compresión, las regiones gaseosas se cubrieron progresivamente por la monocapa de ceramida de tal manera que los agujeros de forma irregular se convirtieron en áreas circulares más pequeñas y los fragmentos sólidos se fusionaron en parches más grandes (figura 7.16, imagen c). Por encima de 5 mN/m, la monocapa se hizo homogénea, entrando en una fase sólida continua, característica del estado de empaquetamiento de la bicapa (Π_{bil} ; ver figura 7.16, imagen d). En el colapso ($\Pi \geq 45$ mN/m), la monocapa se hizo más espesa formando una estructura arrugada (figura 7.16, imágenes e- h). Tras una compresión posterior, las regiones más gruesas aparecieron como ondas de superficie, ensanchándose progresivamente en franjas múltiples (figura 7.16, imágenes e - h). Estas texturas, típicas del proceso de fractura de un sólido durante compresión lateral, son compatibles con la inestabilidad de *buckling* [124].

Por otro lado, se sabe que la esfingomielina tiene un comportamiento fluido en monocapas de Langmuir [125]. Las monocapas de SM, a diferencia de la ceramida, muestran un plateau de coexistencia ($\Pi_{coex} \approx 15-25$ mN/m, dependiendo de la longitud de la cadena) entre la fase de líquido expandido (LE) a bajas presiones y la fase de líquido condensado (LC), típica de estados de empaquetamiento próximos a los encontrados en bicapas [123]. A presiones más altas, las moléculas de SM sufren una transición de empaquetamiento hacia un estado de sólido desordenado [126]. Para el caso de monocapas de eggSM, se observó un plateau de coexistencia LE/LC amplio $\Pi_{coex}^{(SM)} \approx 20$ mN/m (Figura 7.17). Por encima de 20 mN/m hasta alcanzar el colapso, las imágenes de BAM

revelaron un estado de LC homogéneo. Para las mezclas binarias de Cer/SM, se observó que las isothermas π -A se iban expandiendo a mayores áreas y con menor pendiente a medida que se incrementaba el contenido de SM (figura 7.17), en concordancia con el sistema de Cer/SM estudiado por Busto et al. [110]. En el estado de empaquetamiento biológicamente relevante ($\pi_{bil} \approx 30$ mN/m), las monocapas eran homogéneas en el estado LC, aunque se observaron plataformas de bordes irregulares a bajas presiones en monocapas enriquecidas con ceramida (figura 7.17). Por lo tanto confirmamos que en el estado biológicamente relevante, se mantuvo el comportamiento monofásico uniforme de LC para todas las composiciones.

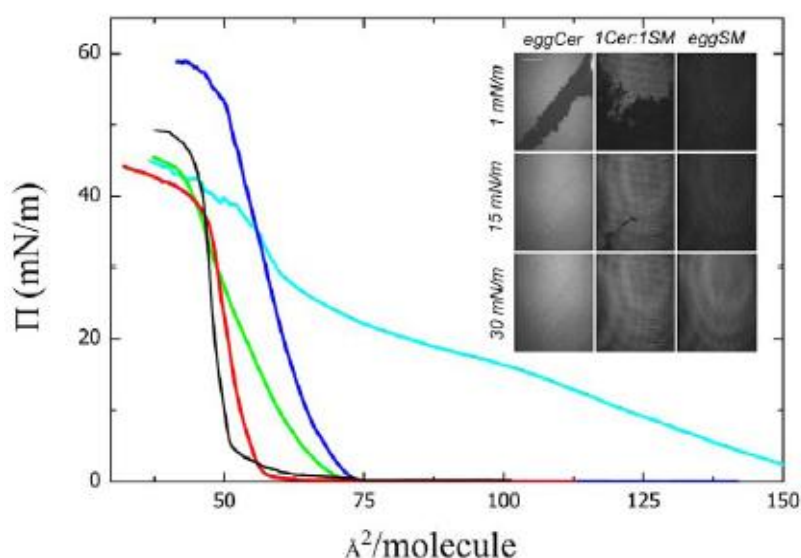


Figura 7.17. Isotherma π -A de mezclas eggCer:eggSM a velocidad de compresión de 5 cm²/min y distintas relaciones molares (—) 1:0; (—) 2:1; (—) 1:1; (—) 1:2 y (—) 0:1. **Recuadro:** Micrografías BAM para monocapas eggCer:eggSM (1:0, 1:1 y 0:1). La escala corresponde a 100 μ m. Las regiones más brillantes corresponden a las monocapas más gruesas.

Viscoelasticidad de compresión

Como ya hemos comentado en varias ocasiones, el módulo de compresión al equilibrio, E_0 , se define como el cambio en la presión superficial de la monocapa, causado por un cambio infinitesimal en

el area molecular. Se puede calcular fácilmente a partir de la derivada numérica de Π -A de las isothermas experimentales,

$$E_0 = -A \frac{\delta \Pi}{\delta A} \quad (5)$$

En el régimen diluido ($A > 50 \text{ \AA}^2$, $\Pi < 5 \text{ mN/m}$), la monocapa de ceramida de huevo es altamente compresible ($E_0 < 50 \text{ mN/m}$). Cuando continua la compresión por debajo de 50 \AA^2 , el módulo de equilibrio aumenta hasta alcanzar un valor máximo ($E_0 \approx 450 \text{ mN/m}$) a un área superficial de $\sim 47 \text{ \AA}^2$ (figura 7.16A, Recuadro interno). Podemos observar que la rigidez máxima aparece a presiones que van de 25 a 35 mN/m, correspondiente a la presión superficial biológicamente relevante [113]. Como era de esperar, una mayor compresión reduce E_0 , cuyos valores pequeños son compatibles con el colapso (figura. 7.16B). La figura 7.18 muestra el módulo de compresión para las mezclas EggCer / EggSM calculado a partir de las isothermas de compresión Π -A de la figura 7.17. Como era de esperar, el módulo de compresión aumentó drásticamente con el aumento de eggCer (ver figura 7.18, Recuadro interno), un hecho relacionado intrínsecamente con el efecto de compactación inducido por los enlaces de hidrógeno de las moléculas de ceramida [110].

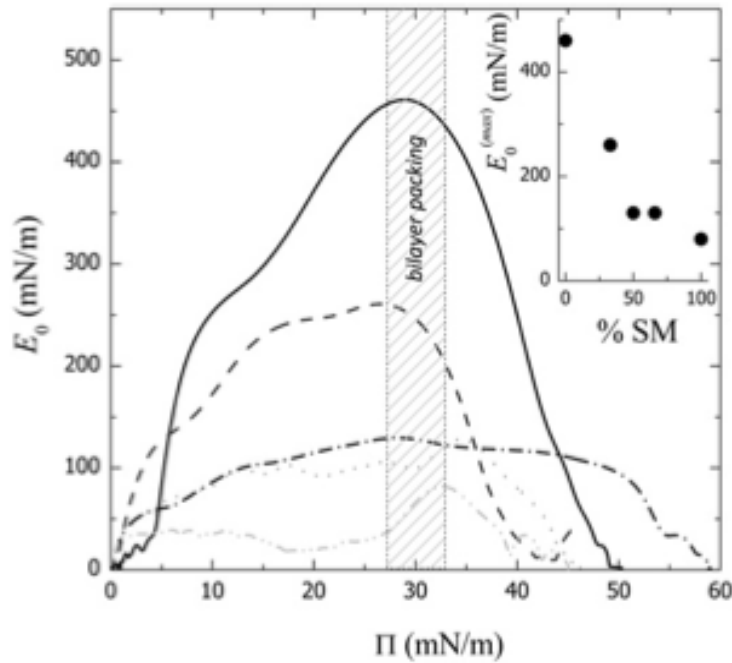


Figura 7.18. Dependencia del módulo de elasticidad E_0 con la presión superficial, para monocapas hechas de mezclas EggCer / EggSM: (línea continua) 1:0 mol; (línea discontinua) 2:1 mol, (línea de puntos y rayas) mol 1:1; (línea punteada) 1:2 mol, y (discontinua-punto-punto línea discontinua) 0:1 mol, y la obtenida a partir de las isothermas de π -A (Ec. 5). (Recuadro interno) dependencia del módulo de elasticidad máxima, E_{0max} , con % de SM medido a la presión lateral biológicamente relevante $\pi_{bil} \approx 30$ mN/m.

La respuesta dinámica resultante de la compresión oscilatoria se midió a una frecuencia constante ($\omega_0 = 2\pi/T = 0.29$ s⁻¹). El rango de amplitudes de deformación que se exploraron va desde 0,3% hasta 6% del área de equilibrio inicial. La figura 7.19 muestra los graficos de esfuerzo-deformación medidos para eggCer y eggSM a un estado de presión superficial de $\pi_{bil} = 30$ mN/m, dentro de la fase LC homogénea de ambos lípidos (ver figura 6.2 para una curva típica). Para eggSM, las curvas experimentales de tiempo se ajustaron a las ecuaciones lineales Ec. 6.5 y 6.6 de la sección de métodos, independientemente de la deformación aplicada. Como era de esperar, sólo el pico fundamental en ω_0 , correspondiente a una respuesta lineal, fue encontrado en el espectro de potencia obtenido por la transformada de Fourier de la curva experimental $\pi(t)$ (figura 7.19, Recuadro interno).

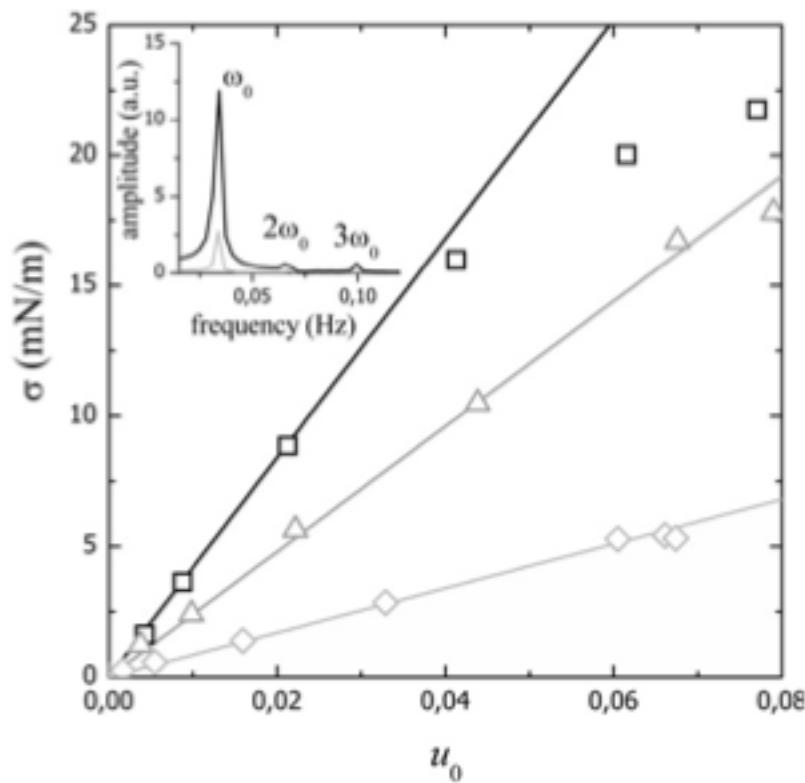


Figura 7.19. Curvas experimentales de esfuerzo-deformación obtenidas para (cuadrado) eggCer; (triangulo) eggCer/eggSM 1:1 mol, y (rombo) eggSM. (Líneas solidas) comportamiento asintótico lineal, caracterizado por el módulo de compresión lineal reportado en la figura 7.18. (Recuadro interno) Transformada de Fourier de las funciones de esfuerzo de eggCer (línea continua negro) y eggSM (línea discontinua gris) medidas $u_0 \sim 4\%$ de la amplitud de deformación. El espectro para eggCer es caracterizado por la presencia de una serie de armónicos ($k\omega_0$) del modo fundamental ω_0 (frecuencia de excitación). Por el contrario para las monocapas de eggSM sólo se encuentra el modo fundamental.

Para este caso de monocapas de esfingomielina, se midió una respuesta lineal típica de un sistema fluido dentro del rango de deformación considerado. En los casos sólidos, se vieron claramente efectos no lineales. En particular, para las monocapas de eggCer, las curvas experimentales en función del tiempo sólo pudieron ser ajustadas con ecuaciones lineales Ec. 6.5 y 6.6 de métodos para deformaciones menores a 1%. Sin embargo, para deformaciones mayores, se necesitan una serie de armónicos para adaptarse a la

respuesta de esfuerzo (véase la Ec. 6.9). Además, la transformada de Fourier muestra en este caso un patrón típico no lineal donde los picos más pequeños corresponden a armónicos más altos del modo de excitación fundamental ω_0 ($\omega_k = k\omega_0$, $k = 2, 3, \dots$) (figura 7.19; Recuadro interno) [121,127]. En este caso, por encima de un umbral de deformación crítico u_c , la curva de esfuerzo-deformación mostró una desviación de reblandecimiento, caracterizada por esfuerzos más pequeños de lo esperado según el comportamiento lineal de Hook $\sigma = E_0 u_0$ (E_0 tomado de Figura 7.18).

La compresión oscilatoria dentro del régimen lineal permite una evaluación adecuada de los efectos temporales. La amplitud de deformación se estableció en todos los casos como 0,5% de la zona de equilibrio inicial, para que estuviese dentro del régimen lineal. La figura 7.20 A muestra los valores de elasticidad de compresión dinámica medida en función de la frecuencia de deformación ω_0 para diferentes sistemas a $\Pi_{bil} = 30 \text{ mN / m}$. Para eggSM, el módulo dinámico $E(\omega)$ se mantuvo constante e independiente de la frecuencia, tomando valores compatibles con el módulo de compresión al equilibrio E_0 . Un comportamiento cualitativamente similar se observó para las monocapas ricas en SM, hasta un contenido de eggSM $\sim 50\%$. Por el contrario, las curvas en función de la frecuencia para monocapas ricas en Ceramida fueron muy diferentes, en donde la elasticidad de compresión mostró una disminución significativa con el aumento de la frecuencia. Este comportamiento demuestra una plasticidad debida a reblandecimiento a altas frecuencias, sugiriendo la presencia de efectos de fluencia a altas velocidades de compresión.

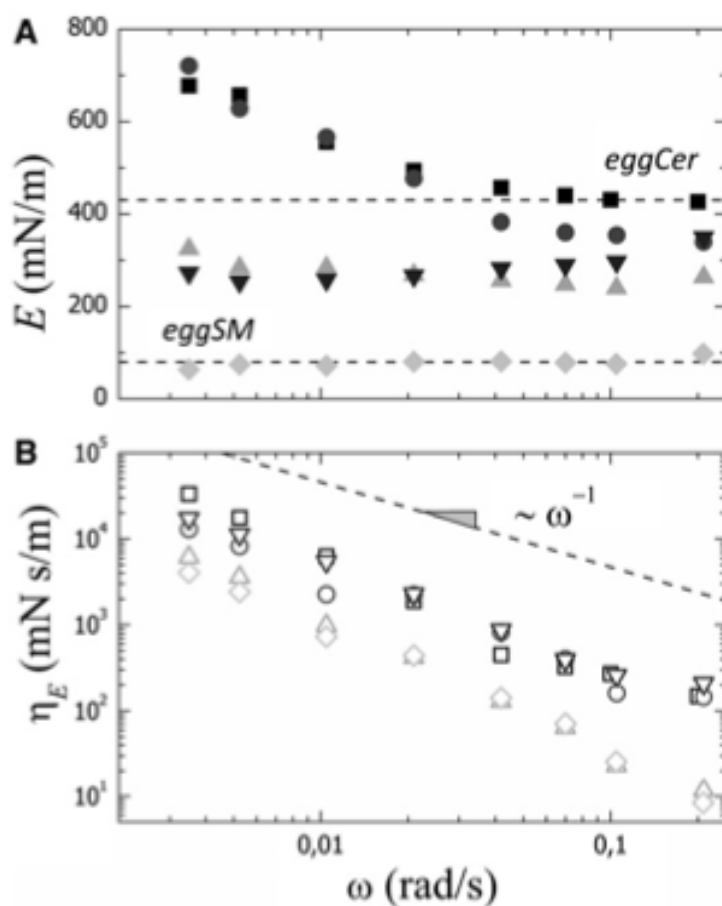


Figura 7.20. A) Módulo de elasticidad de compresión E dependiente de la frecuencia (símbolos sólidos). Valor de equilibrio E_0 obtenido a partir de las isothermas π -A (líneas de puntos) (Figura 7.18). **B)** Viscosidad de compresión dependiente de la frecuencia η_E (símbolos abiertos) obtenido a partir de experimentos de barreras oscilatorias en diferentes monocapas de *eggCer*/*eggSM*: (cuadrado) 1:0 mol; (circulo) 2:1 mol; (triangulo) 1:1 mol; (triangulo invertido) 1:2 mol, y (rombo) 0:1 mol.

La viscosidad de compresión η_E fue evaluada utilizando la Ec. 6.8. Los valores de η_E en función de ω para los diferentes sistemas se representan en la figura 7.20B. Como era de esperar, las monocapas ricas en ceramidas (es decir, carácter solido) exhibieron viscosidades más altas que las monocapas con SM (es decir, carácter fluido). Las

monocapas binarias fueron caracterizadas por viscosidades intermedias, con excepción de la mezcla 1:2 Cer:SM. Esta aparente anomalía (alta viscosidad) podría estar relacionada con la compactación máxima 1:2 debido al complejo molecular anteriormente estudiada por Busto et al. [110] para esta composición molar en particular.

La viscosidad de compresión en función de la frecuencia, sigue una ley de potencia lineal ($\eta_E \sim \omega^{-1}$), típica de un elemento de Voigt con pérdidas viscosas constantes ($E_{\text{loss}} = \omega \eta_E \approx \text{constantes}$). Este comportamiento es característico de los cuerpos sólidos que se deforman con un módulo elástico significativamente superior a las pérdidas viscosas asociadas. ($E_0 \gg E_{\text{loss}} = \omega \eta_E$). Así como las monocapas de ceramida, las monocapas de mezclas exhibieron un comportamiento dinámico similar, lo cual muestra el carácter denso de estos sistemas sometidos a compresión, ($\eta_E \sim \omega^{-1}$), independientemente de su naturaleza química.

7.5. Reología de cicalla de monocapas mixtas de ceramida/esfingomielina

El carácter sólido de las monocapas ricas en ceramidas se observa mejor en los experimentos mecánicos que presentan una respuesta finita a la cizallamiento ($G' > 0$). Para evitar efectos no lineales se requiere identificar previamente el régimen lineal. La figura 7.21A muestra las curvas de esfuerzo-deformación determinadas durante el cizallamiento de las monocapas al estado de presión superficial biológicamente relevante ($\Pi_{\text{bil}} = 30 \text{ mN/m}$) y a una frecuencia constante (1Hz). Para monocapas de eggSM, el flujo viscoso fue caracterizado por una respuesta del esfuerzo casi lineal, $\sigma = \sigma_v = G'' \gamma$ (flujo newtoniano) y $\sigma_E \approx 0$, que corresponde a un módulo de cizallamiento cero, $G' \approx 0$ (sin resistencia al cizallamiento) (véase la figura 7.21B). Al contrario, la respuesta del esfuerzo de las monocapas de eggCer contenía componentes tanto elásticas como viscosas ($\sigma = \sigma_E + \sigma_v$), con un almacenamiento elástico más alto que las pérdidas viscosas ($G' > G''$; véase la figura 7.21B y C). En este caso, la curva de respuesta exhibió un plateau de plasticidad caracterizado por un límite elástico bajo ($\sigma_Y \approx 0,8 \text{ mN/m}$; ver figura 7.21A). Esto define la plasticidad en deformaciones por cizallamiento mayores a 1% para eggCer, a partir del cual identifica

al sistema como un sólido blando. La respuesta de la cizalla en función de la frecuencia fue probada a bajas deformaciones ($\gamma = 0,5\%$), escogidas para ser menores que el límite de elasticidad ($\gamma_Y \approx 1\%$; ver figura 7.21A) y por lo tanto, dentro del régimen lineal.

La figura 7.22A muestra los valores experimentales de los parámetros de cizalla en función de la frecuencia. Para la eggCer se obtuvo un valor de módulo de cizallamiento bastante alto ($G' \approx 75$ mN/m) y sistemáticamente mayor que el módulo de pérdida ($G' \gg G''$), como se esperaba para un material sólido capaz de resistir cizallamiento lateral (21). Por otro lado, no se detectó rigidez a cizalladura para las monocapas de eggSM ($G' \approx 0$), de nuevo una prueba irrefutable de la fluidez en el estado de presión superficial biológicamente relevante ($\pi_{bil} = 30$ mN/m). Por otra parte, la viscosidad de cizallamiento de esfingomielina resultó ser inferior a la de las monocapas de eggCer en varios órdenes de magnitud (figura 7.22B), lo que indica el carácter pastoso de la ceramida con respecto a su precursor fluido, la esfingomielina. De hecho, la eggSM era tan fluida con respecto a la eggCer que, a frecuencias bajas, los valores de viscosidad de cizalla cayeron por debajo de la resolución experimental del bicono del reómetro (ver eggSM con $\omega < 1$ s⁻¹ en la figura 7.22B).

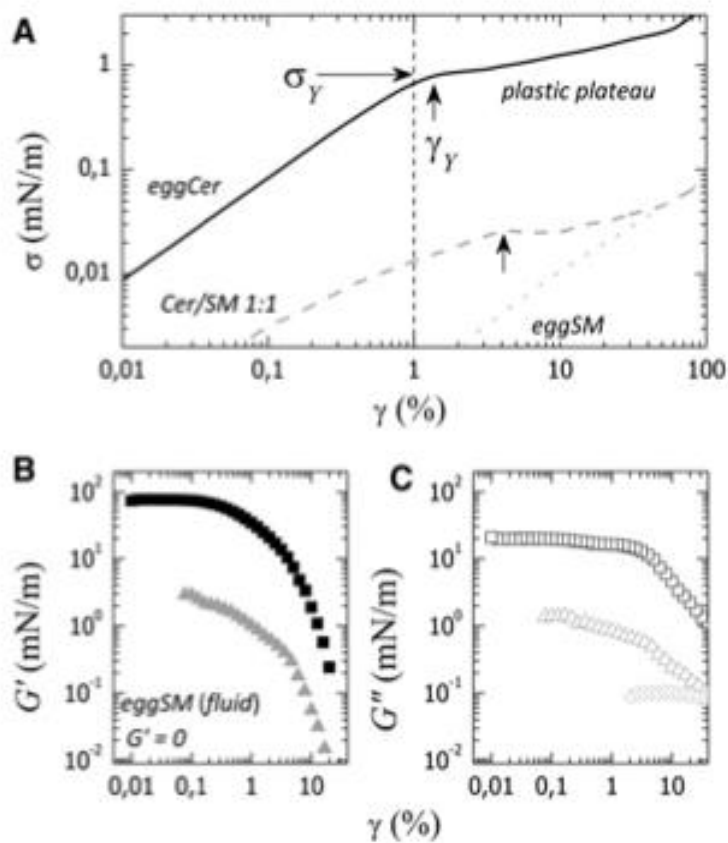


Figura 7.21 A) Curva experimental de esfuerzo- deformación medida a frecuencia fija de 1 Hz para diferentes monocapas de eggCer/eggSM: (cuadrado, línea continua) 1:0 mol, (triángulo, línea discontinua) 1:1 mol, y (rombo, puntos) 0:1 mol. El límite elástico σ_Y define un plateau plástico en γ_Y . La línea de puntos vertical define el límite del régimen lineal y no lineal. B) Dependencia de la deformación con el módulo de cizallamiento G' (símbolos sólidos) y C) con la pérdidas de cizallamiento por fricción G'' (símbolos abiertos) obtenidas para las mismas mezclas eggCer/eggSM mostradas en A).

De manera análoga a los datos obtenido en compresión de eggCer y sus mezclas con SM, la dependencia de la viscosidad de cizallamiento con la frecuencia también muestra una ley de potencia lineal, $\sim \omega^{-1}$, de nuevo una evidencia de las pérdidas constantes en estas monocapas densas. Sin embargo, se demostró un comportamiento distinto para las monocapas de eggSM fluidas, con una muy baja viscosidad, casi independiente de la frecuencia ($\eta_s \sim$

ω^0), característico de un flujo newtoniano. Las monocapas binarias exhibieron módulos de cizallamiento intermedios entre las monocapas individuales de cada lípido (figura 7.21B) con una inversión de los valores absolutos en la composición de $\sim 2:1$ (Cer/SM) (figura 7.21C). Por lo tanto, los estados ricos en ceramida ($x_{\text{Cer}} > 66\%$) se pueden clasificar como "pastosos" porque muestran una alta rigidez a la cizalladura y una también alta viscosidad ($G' > G''$). Por lo que estas monocapas ricas en ceramidas también son capaces de desarrollar flujo bajo esfuerzo lateral, debido a que los sólidos son capaces de resistir el cizallamiento. Obviamente, la esfingomielina fluida causa cierto desorden en estas monocapas, cuantificado como una disminución en el módulo de cizallamiento (i.e., softening) seguido por una disminución discreta de la viscosidad (i.e., thinning).

El aumento del desorden es tal que, al contenido de esfingomielina $> 33\%$, la monocapa se somete a una inversión mecánica con mayores pérdidas viscosas que el almacenamiento elástico. En este régimen de composición ($x_{\text{Cer}} < 66\%$), las monocapas se convierten en un cuerpo viscoelástico con propiedades de flujo que dominan sobre elasticidad ($G' < G''$). En el estado óptimo de compactación binaria (1:2 Cer/SM)[110], el sistema mixto conserva aún cierta rigidez mecánica ($G' \approx 3 \text{ mN/m}$). Sin embargo, a mayores contenidos de SM ($x_{\text{Cer}} < 33\%$), los sistemas pueden ser clasificados como fluidos viscosos ($G'' > G' \approx 0$), con propiedades de flujo similares a la SM fluida. Utilizando los valores experimentales de G' y G'' , se puede construir una escala relativa de dureza, definida como el porcentaje de la relación G'/G'' . En esta escala, se asigna el 100% de dureza a la eggCer y el 0% para la eggSM pura ($G'/G'' = 0$). La figura 7.22D muestra cómo varía la dureza de la monocapa en función del contenido de SM. En efecto, la introducción de eggSM hizo la monocapa de ceramida progresivamente menos dura de tal manera que sólo un 10 % de SM produce un $\sim 50\%$ de reblandamiento con respecto a la ceramida pura. Mayores contenidos de SM inducen un reblandecimiento progresivo sobre la ceramida, la cual se convirtió prácticamente fluida en la composición fisiológica 1:2 Cer/SM y a mayores concentraciones de SM también ($G'/G'' \leq 20\%$).

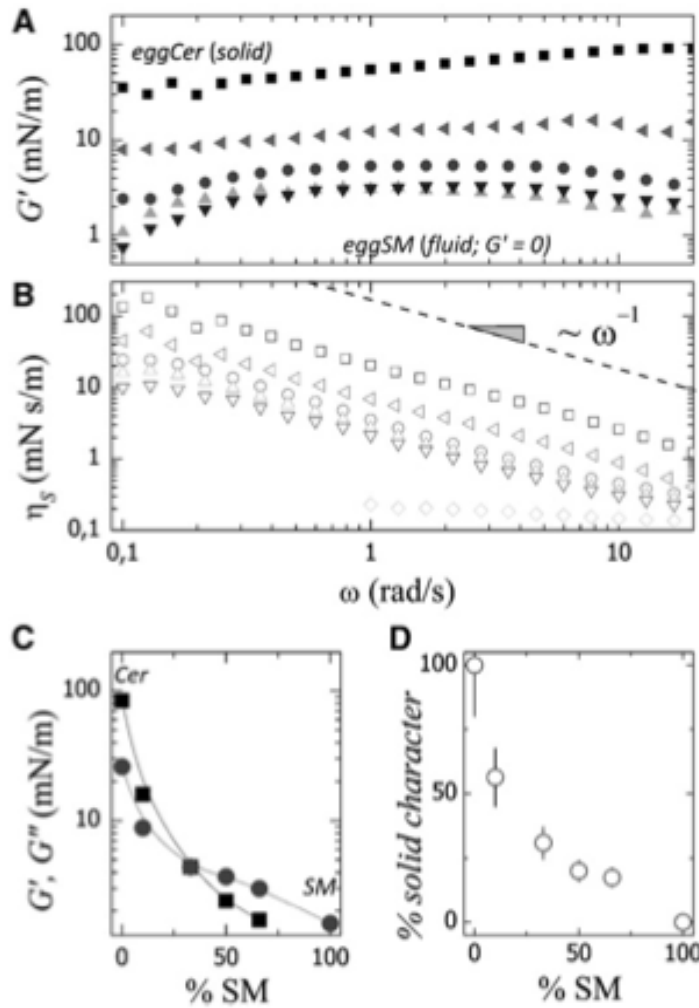


Figura 7.22 A) Dependencia del módulo de cizallamiento G' con la frecuencia y B) Viscosidad de cizalla η_s obtenidos a partir de experimentos oscilatorios de cizalla a una amplitud de deformación fija de 0,5% para diferentes monocapas eggCer/eggSM: (cuadrado) 1:0 mol; (triángulo a la izquierda) 9:1 mol, (círculo) 2:1 mol; (triángulo hacia arriba) 1:1 mol; (triángulo hacia abajo) 1:2 mol, y (rombo) 0:1 mol. C) Módulo de cizallamiento G' (cuadrado) y pérdidas de cizallamiento por fricción G'' (círculo) medidos a una frecuencia fija de 10 Hz y representado como una función del contenido de SM presente en las mismas mezclas eggCer/eggSM de las partes A y B. D) Carácter sólido (definido como un porcentaje de la relación G'/G'') de las mismas mezclas eggCer/eggSM de las partes A y B representado en función del contenido de SM%.

7.5. Particle tracking

Los objetos embebidos en las membranas biológicas (tales como proteínas de transmembrana o partículas hidrófobas) se someten al movimiento browniano bajo la acción de la energía térmica. Obviamente, si la membrana es viscosa se introducen altas restricciones a la difusión de las partículas mediante una alta fricción impuesta. En consecuencia, las movilidades laterales pueden ser correlacionadas con el comportamiento de flujo descrito anteriormente para las monocapas de esfingolípidos en general. Así, el movimiento lateral de partículas embebidas en membranas que contienen ceramida podría ser mucho más lento que el movimiento de las mismas en un entorno basado en SM fluida. Para abordar cuantitativamente esta conjetura, rastreamos la difusión lateral de micropartículas embebidas dentro de las mismas monocapas lipídicas exploradas anteriormente. Se utilizaron micropartículas de PMMA sin carga, como sondas hidrófobas de movimiento que interaccionan con la monocapa lipídica bajo condiciones de fricción. Para la realización de los experimentos, se escogió una densidad superficial de partículas muy baja, para que las interacciones entre partículas pudieran ser despreciables.

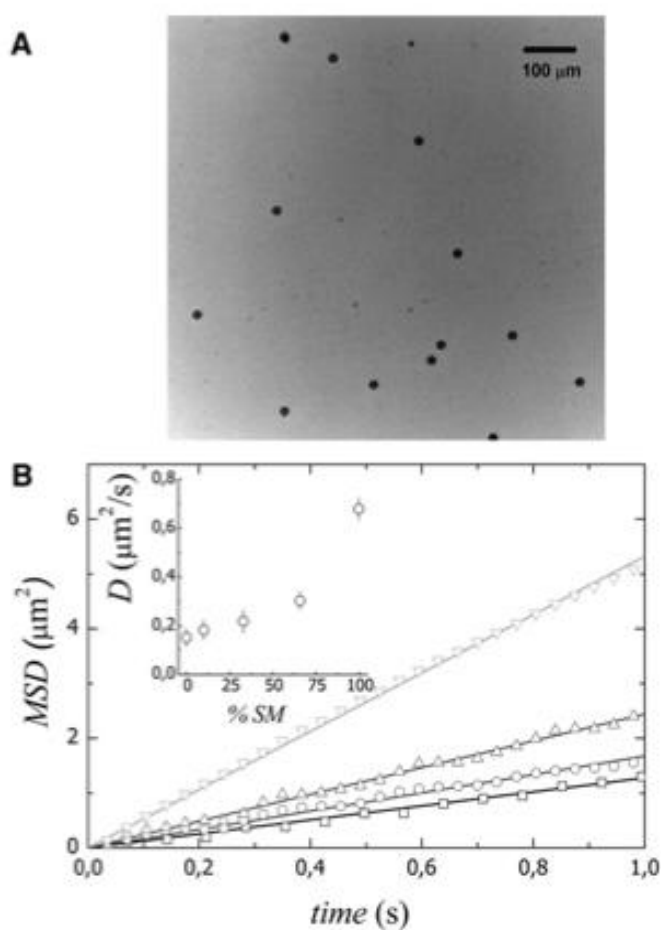


Figura 7.23 A) Imagen típica que muestra varias micropartículas de PMMA (con un recubrimiento superficial bajo) repartidas en una monocapa de eggSM pura. B) Desplazamientos cuadráticos medios (MSDs) para partículas de PMMA de $5,75 \mu\text{m}$ de diámetro en diferentes monocapas de eggCer/eggSM: (cuadrado) 1:0 mol; (circulo) 2:1 mol; (triangulo hacia arriba) 1:2 mol, y (triangulo hacia abajo) 0:1 mol. (Recuadro interno) Coeficiente de difusión obtenido a partir del ajuste lineal de los MSDs en función del contenido de SM presente en las mezclas eggCer/eggSM.

La figura 7.23A muestra un campo de microscopía típico que contiene unas micropartículas PMMA adsorbidas en una monocapa lipídica. Mediante el procedimiento descrito en la sección de métodos, se midieron los coeficientes de difusión de las

micropartículas en diferentes monocapas de lípidos basadas en ceramida de huevo y sus mezclas con la esfingomielina. En estas condiciones, las partículas suelen verse afectadas por el movimiento browniano en dos dimensiones y los desplazamientos cuadráticos medios (MSDs) siguen las Ecs. 6.11 y 6.12. La figura 7.23B muestra la evolución temporal de los MSD. Cada trayectoria MSD representa un promedio de más de ~ 200 partículas en diferentes lugares de una muestra y en diferentes muestras (véase Métodos para más detalles). Los resultados muestran que los MSDs aumentan con el contenido de eggSM, como se espera un aumento de la fluidez de la monocapa.

El análisis de los MSDs mediante la Ec. 6.12 proporciona valores efectivos para el coeficiente de difusión de las partículas. Del ajuste lineal de las curvas experimentales de MSD, se obtuvieron valores absolutos de $D^{(SM)} = 0.68 \pm 0.04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $D^{(Cer)} = 0.15 \pm 0.05 \mu\text{m}^2/\text{s}$ para eggSM pura y eggCer respectivamente (figura 7.23, recuadro interno). Estos valores coinciden con datos obtenidos previamente en la literatura para sistemas similares [109]. En las mezclas binarias se observaron movilidades intermedias (figura 7.23, recuadro interno). De estos resultados se puede decir que la difusión lateral en las monocapas de eggCer sólidas disminuye en un $\sim 78 \%$ con respecto a las monocapas de eggSM fluidas. En general, los datos de la figura 7.23 muestran como la difusión de las partículas disminuye con el aumento del contenido de ceramida, una tendencia compatible con el aumento de la viscosidad reportado en la sección anterior.

8. DISCUSIÓN

8.1. monocapas de ceramida de huevo

Propiedades de equilibrio

Las isothermas de compresión de eggCer obtenidas son similares a las isothermas de monocapas de ceramida publicadas previamente en la literatura [110, 123]. A presiones superficiales muy bajas ($\pi \approx 0$, $A > 50 \text{ \AA}^2$), el BAM reveló la coexistencia de fases sólidas y gaseosas. En $\pi \approx 5 \text{ mN/m}$ ($A < 50 \text{ \AA}^2$), la monocapa se vuelve homogénea y completamente sólida ($G' > G''$). Un comportamiento de fase similar para ceramidas sintéticas se ha publicado previamente por Fanani y Maggio [123]. Tras una compresión mayor aparecen líneas de ruptura de la monocapa, lo que indica la aparición de colapso [128] que se alcanza cuando la presión superficial llega a su máximo.

Propiedades mecánicas

Los parámetros mecánicos de las monocapas de Langmuir de ceramidas puras deberían proporcionar información útil para entender sus propiedades estructurales y, también, los motivos de la segregación en mezclas de lípidos complejos. Los estudios mecánicos sobre monocapas de ceramida pura son relativamente escasos y se centran principalmente en las propiedades de equilibrio obtenidas a partir de las isothermas de compresión (40,45). A partir de esos estudios, se sabe que las monocapas de ceramida poseen una compresibilidad muy baja en comparación con los lípidos más comunes (47). Además de la caracterización estructural, esta tesis demuestra inequívocamente a través de la reología superficial el carácter sólido de las monocapas de ceramida. Este comportamiento sólido es radicalmente diferente al de la mayoría de los lípidos que componen las membranas biológicas. Las diferencias se encuentran en particular en la elasticidad de compresión y cizalla como se describe a continuación.

Elasticidad de compresión. En el régimen diluido ($A > 50 \text{ \AA}^2$), las monocapas son relativamente compresibles ($E < 50 \text{ mN/m}$, $K \approx 0$

mN/m). Sin embargo, por debajo de 50 \AA^2 , ambos módulos aumentan fuertemente con la disminución de la superficie accesible a las moléculas de eggCer, un hecho probablemente relacionado con las interacciones atractivas de los enlaces de hidrógeno entre las cabezas de ceramidas [129]. En el estado biológicamente relevante ($\pi_{\text{bil}} \approx 30 \text{ mN/m}$) [113], el módulo uniaxial es alto ($E > 300 \text{ mN/m}$) en comparación con el de las monocapas típicas de lípidos fluidos, tales como POPC o lípidos de *E. coli* (representativos de membranas eucariota y procariotas, respectivamente), para los cuales los valores son mucho más bajos (100 mN/m) a esta misma presión [130]. Incluso para esfingolípidos saturados en el estado de gel, tales como esfingomielina C16 a temperatura ambiente ($T_m \approx 40^\circ \text{C}$), el módulo uniaxial ($E \approx 100 \text{ mN/m}$) también es inferior que el de las monocapas de eggCer y similar al de las monocapas fluidas. Los módulos para las monocapas de ceramida son similares a los de monocapas de DPPC de tipo gel ($E \approx 300 \text{ mN/m}$) [131] o a los de las monocapas líquidas que contienen grandes contenidos de colesterol, tales como las mezclas de esfingomielina y colesterol (SM/Chol 1:1 molar; $K \approx 400 \text{ mN/m}$) [97]. Se han medido valores del módulo de compresión de hasta 300 mN/m para la ceramida de cerebro de bovino [132,133] 400 mN/m para ceramida C24:1, y 600 mN/m para ceramida C16 [134]. Un estudio de monocapas de ceramida C16 ha puesto de manifiesto que su módulo de compresión disminuye significativamente al pasar la temperatura de transición del estado sólido al estado líquido condensado (de 700 mN/m para el sólido a 200 mN/m para el líquido condensado (LC)) [110]. Además, pequeñas cantidades de ceramidas (10% mol) hacen aumentar el módulo elástico de las membranas fluidas en un factor de 4 y 2, para bicapas en la fase de líquido desordenado (L_d) y de líquido ordenado (L_o) respectivamente [135]. En cuanto a la dependencia de la elasticidad dinámica con la frecuencia, las monocapas de ceramida difieren también significativamente de los sistemas fluidos.

Primeramente, el módulo de almacenamiento es mucho mayor que el módulo de pérdidas, $E' \gg E''$ (véase la figura 7.5), como se espera para sólidos elásticos. En el estado biológicamente relevante ($\pi_{\text{bil}} \approx 30 \text{ mN/m}$), E' es muy grande ($E' > 400 \text{ mN/m}$) en comparación con las típicas monocapas de lípidos fluidos. El "softening" dinámico observado en los estados más densos (véanse las figuras 7.4A y 7.5A) es también característico de sólidos blandos, que puede ceder

localmente cuando se comprime más rápido que el tiempo microscópico necesario para el deslizamiento molecular [136]. Los efectos de fluencia se muestran en las curvas de esfuerzo-deformación (véase la figura 7.4A), en donde se observan comportamientos plásticos no lineales. A presiones moderadas por debajo del colapso, el carácter cuasi-reversible de los ciclos de histéresis (véase la figura 7.4B) sugiere que el reblandecimiento plástico puede estar relacionado con un potencial de interacción anarmónico más que a un transporte difusivo irreversible [121,137]. Sin embargo, al entrar en el colapso, una fuerte irreversibilidad caracteriza los ciclos de compresión-expansión (datos no mostrados), como cabe esperar, sobre todo si ocurren fracturas en la monocapa.

Elasticidad de Cizalla. En el estado biológicamente relevante, las monocapas de ceramida se caracterizan por un valor grande del módulo de cizalla, $G' \approx 80$ mN/m, un valor de 3 órdenes de magnitud mayor que el medido para las monocapas de lípidos en el estado gel, como DPPC [48]. En la figura 8.1 se muestran los valores de la relación de Poisson, $\nu = (K - G)/(K + G)$, utilizando los valores experimentales del módulo de compresión y cizalla en las figuras 7.1C y 7.9A (para $\gamma \rightarrow 0$), respectivamente. Como era de esperar, se observa una disminución monótona entre un valor compatible con un fluido incompresible ($G = 0$; $\nu = 1$) y un sólido con aumento del módulo de cizalla ($0 < T < K$; $1 > \nu > 0$) al ir aumentando la presión de la monocapa. A baja presión, el módulo de cizalla se desvanece ($G \approx 0$); por lo tanto, el sistema se comporta como un fluido incompresible ($\nu = 1$). El límite $\nu = 0$ corresponde a un sólido rígido con $G \approx K \rightarrow \infty$. Petkov et al. [138] mostró que G también se puede determinar usando las isothermas de compresión medidas con las placas de Wilhelmy paralelas y perpendiculares respectivamente a las barreras de compresión:

$$\begin{aligned} E_{||} &= K + G \\ E_{\perp} &= K - G \end{aligned} \quad (\text{Ec 8.1})$$

La figura 8.2 muestra que estas relaciones se cumplen aquí siempre que se utilicen las isothermas medidas a la velocidad de compresión mayor (100 cm²/min). Esto confirma que la relajación no tiene tiempo para proceder a esta velocidad, de acuerdo con el hecho de

que $E_{||}$ es igual a E' en el rango de frecuencias estudiadas (excluyendo los datos a altas frecuencias de las presiones superficiales mayores, §7.1). Para $A < 55 \text{ \AA}^2$, $E_{||}$ y E_{\perp} disminuyeron debido a la aparición del colapso, por lo que se pierde la validez de la Ecs. 8.1.

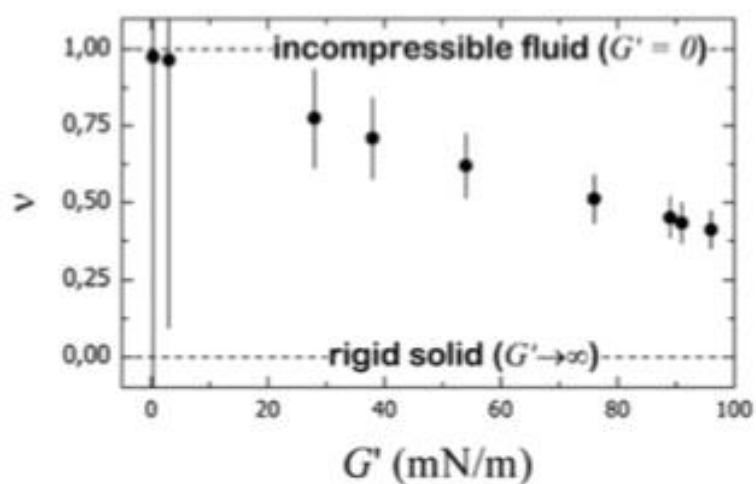


Figura 8.1 Dependencia de la relación de Poisson con el módulo de cizalla calculado a partir de los módulos de compresión y cizalla en las figuras 7.1C y 7.9A (en $\gamma \rightarrow 0$), respectivamente. El valor de la monocapa con carácter fluido se alcanza solamente cuando la rigidez de cizalla desaparece ($\nu = 1$ en $G = 0$).

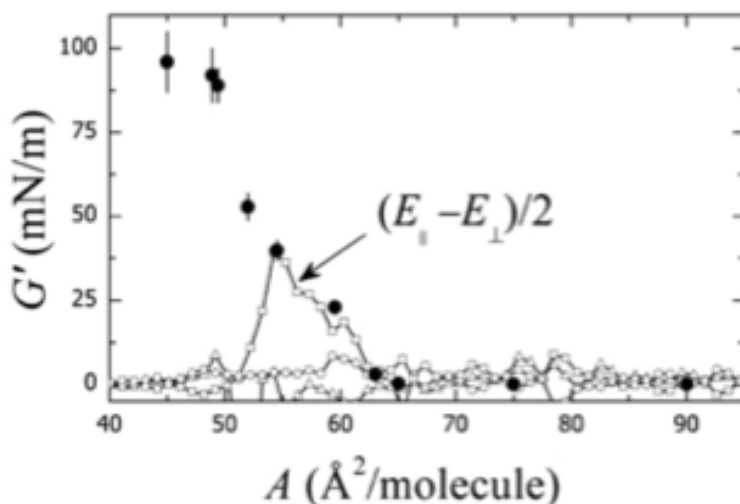


Figura 8.2. Dependencia del módulo de cizalla con el área molecular media de lípidos: (símbolos rellenos; ●) obtenido a partir del límite inferior de γ en la Figura 7.9; (símbolos huecos) obtenido a partir de las ecuaciones 8.1 con las mediciones de anisotropía de la figura 7.2 y para diferentes velocidades de compresión: 100 (\square), 50 (\circ), y 1 cm^2/min (Δ).

Pérdidas viscosas

Se observaron pérdidas viscosas mucho más altas para las monocapas de ceramida que para las monocapas fluidas de lípidos como POPC y E-coli [48]. En el estado biológicamente relevante ($\pi_{\text{bil}} = 30 \text{ mN/m}$), el módulo de pérdidas por compresión de monocapas de eggCer es alto $E'' \approx 50 \text{ mN/m}$, mayor que el de la fase gel de DPPC ($E'' \approx 10 \text{ mN/m}$) [131] o que el de monocapas fluidas ($E'' \approx 5 \text{ mN/m}$ para lípidos de E.coli y para POPC) [120]. Se obtuvieron conclusiones similares a partir de los experimentos de cizallamiento: las pérdidas viscosas por cizallamiento son significativamente más altas para las ceramidas ($G'' \approx 10 \text{ mN/m}$) que para monocapas fluidas (típicamente $G'' < 0,1 \text{ mN/m}$) [48] y que para esfingomielina saturadas y otras mezclas de fosfolípidos condensados que contienen colesterol. En general, se observaron módulos viscosos menores a los módulos de almacenamiento ($E''/E' < 1$, la figura 7.5, $G''/G' < 1$, figura 7.9), lo cual resalta el carácter predominantemente sólido de las monocapas de ceramida. Esto se acentúa en las curvas de la figura 8.3, que también pone de manifiesto la relación existente entre las pérdidas por fricción y los módulos de almacenamiento

elástico con el aumento del empaquetamiento molecular (aumentando E' y G' , respectivamente).

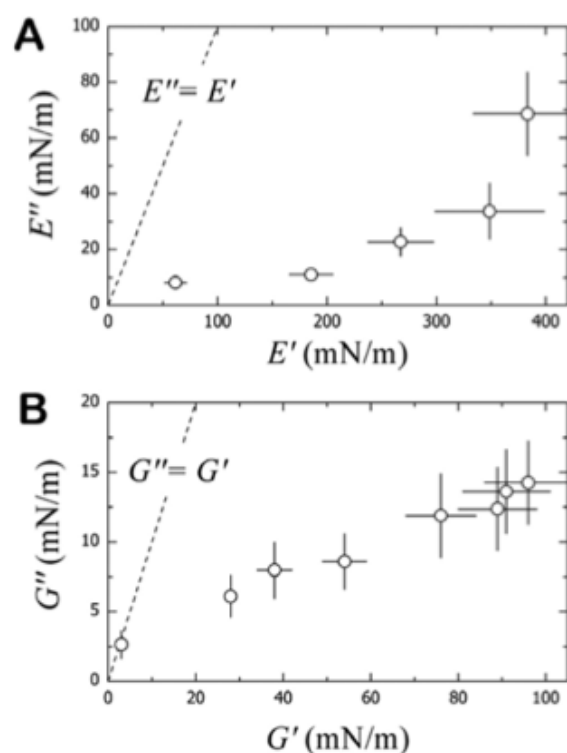


Figura 8.3. Correlación entre los módulos de pérdidas y los correspondientes módulos de almacenamiento para monocapas de eggCer. **A)** de compresión (3,5 MHz; $u = 0.01$) y **B)** de cizalla (1 Hz; $u = 5 \times 10^{-4}$). Las líneas corresponden en ambos casos a módulos de pérdida igual a módulos de almacenamiento.

Plasticidad mecánica

La plasticidad describe la deformación no reversible de un material elástico más allá del régimen lineal de Hook. La deformación plástica se produce en respuesta a un esfuerzo aplicado que excede el límite elástico o punto de fluencia. En las monocapas sólidas estudiadas, a bajas deformaciones la respuesta al esfuerzo es lineal, independientemente de la naturaleza de la deformación (cizalla o compresión) y / o el estado de empaquetamiento molecular (véanse las figuras 7.4A y 7.7A, respectivamente). Más allá de una deformación crítica, tanto en la compresión (u_C , figura 7.4A) como en la cizalla (γ_C , figura 7.7A), se observa la plasticidad, es decir, el

esfuerzo crece más lentamente con el aumento de la deformación. Como consecuencia, los módulos efectivos E' y G' son más pequeños que sus límites Hookeanos. En los módulos de pérdida se observaron características no lineales similares (figura 7.8B), los cuales exhiben un "melting" de cizalla. A bajo esfuerzo, G'' es independiente de la deformación (o velocidad de deformación), mientras que a mayor esfuerzo disminuye y cae a cero ("melting" de cizalla), de manera similar a otros sistemas de monocapas densas [139,140]. La figura 8.4 muestra la dependencia de los módulos de pérdida con el área molecular a una frecuencia ($0,1 \text{ s}^{-1}$) y a una velocidad de cizalla elevada (900 s^{-1}). A baja densidad de empaquetamiento, G'' es independiente de la velocidad de cizalla ($G'' \approx 3 \times 10^{-2} \text{ mN/m}$ en $A > 70 \text{ \AA}^2$).

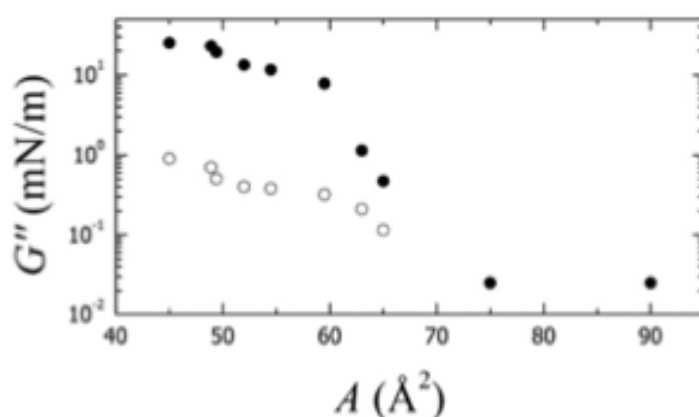


Figura 8.4. Dependencia del módulo de pérdidas con el área de los lípidos a dos velocidades de cizalla y a una frecuencia constante (1 Hz): baja velocidad (○) en $\gamma' = 0,1 \text{ s}^{-1}$; alta velocidad (●) a $\gamma' = 900 \text{ s}^{-1}$.

El fenómeno no lineal de "melting" de cizalla se hace más pronunciado a medida que disminuye el área molecular, un comportamiento compatible con el dominio progresivo del mecanismo de plasticidad con el aumento de empaquetamiento: véanse las figura 7.7B y 7.7C donde se muestra que el límite de deformación por cizalla γ_c y el límite de esfuerzo σ_y aumentan progresivamente con la disminución del área molecular. Las deformaciones plásticas están probablemente relacionadas con los cambios en la estructura de monocapa. En el punto de fluencia, la energía (por unidad de área) necesaria para una distorsión de

plástico, $E_{\text{plas}} = \sigma_Y u_C$, aumenta con la presión superficial, como se muestra en la figura 8.5.

A presiones superficiales bajas esta energía es comparable a la energía elástica, $E_{\text{plas}} \approx F_T = \frac{1}{2} G' u^2$. Sin embargo, a mayor presión ($\pi > 10 \text{ mN/m}$), la energía se convierte progresivamente en una energía independiente de la presión, ya que su contribución de fricción a la energía elástica global es cada vez más pequeña. Estas deformaciones plásticas se observan en la mayoría de los materiales sólidos, sin embargo, su mecanismo físico subyacente puede variar ampliamente dependiendo de su estructura microscópica. Para los sólidos cristalinos, la plasticidad es una consecuencia del orden de largo alcance [136, 141]. Cuando se realiza un esfuerzo paralelo a un eje cristalográfico, una línea de dislocación puede deslizarse una gran distancia pasando una a la otra, a lo largo de sus direcciones cristalográficas, lo que resulta en su totalidad en una deformación plástica. Tal deslizamiento se ve favorecido por la presencia de otras dislocaciones, que permiten al material de someterse a grandes deformaciones sin cambios significativos en su distribución molecular [136]. En consecuencia, la energía involucrada en la deformación plástica de un sólido ordenado es relativamente menor que la energía de cohesión de la red cristalina. Este mecanismo sin embargo no existe en los materiales amorfos o de menor densidad, ya que carecen de orden de largo alcance. Estos materiales todavía pueden someterse a una deformación plástica gracias a la gran cantidad de volumen libre presente en estos sistemas, que con el esfuerzo suficiente podría ser redistribuido fácilmente. En ese caso, sin embargo, la energía plástica por lo general representaría una alta fracción de la energía mecánica. Este mecanismo podría ser relevante para las deformaciones plásticas observadas a estados de baja presión, pero a presiones más altas, definitivamente el mecanismo de dislocación podría llegar a ser dominante. En el presente sistema, se ha puesto de manifiesto por microscopía de ángulo de Brewster la existencia de bandas de dislocación que aparecen tras la deformación lateral (ver figura 7.1). Durante la compresión uniaxial, los defectos por dislocaciones aparecen a presiones bajas como $\pi \approx 15 \text{ mN/m}$ ($G_o \approx 20 \text{ mN/m}$), y se van haciendo cada vez más dominantes a presiones más altas acercándose al colapso (ver imágenes de BAM en la figura 7.1). En consecuencia, una plastificación cada vez mayor podría explicarse

como una influencia progresiva del mecanismo de deslizamiento debido a un número cada vez mayor de las dislocaciones.

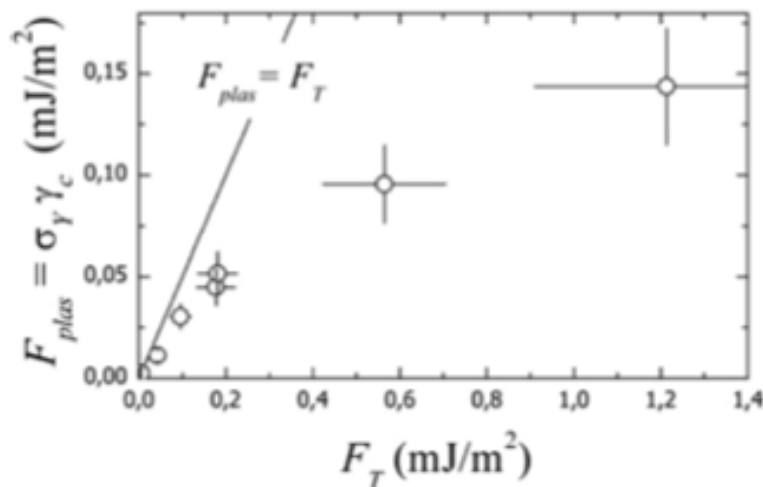


Figura 8.5. Energía de elasticidad límite involucrada en la deformación plástica (energía plástica (F_{plast}) vs energía elástica total (F_T)). La línea corresponde a $F_T = F_{plas}$.

Termomecánica

De los estudios termomecánicos, un nuevo comportamiento termomecánico se puede trazar para ceramidas de huevo. A muy bajas temperaturas ($< 20^\circ\text{C}$) las ceramidas se comportan como materiales sólidos capaces de soportar deformaciones de cizalla. Por encima de esta temperatura, las ceramidas se reblandecen mecánicamente aunque muestran todavía características sólidas ($G' > G'' > 0$). A temperaturas fisiológicas, las fases condensadas penetran en una fase LC+LE caracterizada por un módulo elástico de cizalla próximo a cero, pero soportan deformaciones de compresión, es decir las ceramidas de huevo se comportan como fluidos macroscópicos. Sin embargo, mediante las imágenes BAM, sabemos que dominios en fase condensada coexisten con la fase líquida expandida. Cabría esperar que la presencia de núcleos ordenados dentro de la fase fluida debería incrementar la rigidez de membrana ya sea bajo cizalla o bajo compresión. Sin embargo, los dominios no están interconectados entre ellos y el sistema podría fluir entre los canales fluidos producidos por la matriz continua LE [131, 142]. Además, efectos de desorden molecular y de lubricación podrían aumentar el carácter fluido de mezclas bifásicas [¡Error!

Marcador no definido.] A más altas temperaturas, las ceramidas de huevo sufren una transición a una fase LE, caracterizadas de nuevo por módulos de cizalla nulos. Es interesante recalcar que el sistema compuesto es viscoelástico sólo dentro del estado monofásico LC, donde los dominios condensados forman una sola fase. Además, de manera interesante, la fase fluida es arrestada durante un ciclo de enfriamiento, con un desplazamiento de la temperatura de transición a menores temperaturas (figura 7.12). La percolación de dominios LC necesita de una cantidad de energía extra para formar la fase continua. Comportamiento que podría tener importantes consecuencias biológicas que se discuten más adelante.

8.2. Monocapas mixtas de ceramida y esfingomielina

De nuestro estudio reológico superficial, ya hemos mostrado datos inequívocos que evidencian el carácter sólido de las monocapas de ceramida de huevo, un comportamiento radicalmente diferente a la mayoría de los lípidos que forman las membranas biológicas, en particular con su precursor, la esfingomielina. Las diferencias más importantes se encuentran particularmente en las siguientes propiedades.

Propiedades mecánicas

Elasticidad de la compresión. El módulo de equilibrio para la ceramida de huevo en el estado de empaquetamiento biológicamente relevante ($\Pi_{bil} \approx 30$ mN/m), es muy alto ($E_0 \approx 450$ mN/m), en comparación con los típicos lípidos fluidos (≈ 100 mN/m), como por ejemplo, el POPC y los lípidos de *Escherichia coli*, representativos de las membranas eucariotas y procariotas, respectivamente [121]. Esta alta rigidez a la compresión es incluso mucho mayor que la encontrada para los esfingolípidos saturados ($E_0 \approx 100$ mN/m para C16-SM) (13), para los fosfolípidos ($E_0 \approx 300$ mN/m para DPPC) [131] en fase de gel, y para las monocapas de líquidos ordenados compactadas por altos contenidos de colesterol ($E_0 \approx 400$ mN/m para mezclas 1SM/1Chol) [132]. Este hecho resalta que las monocapas de ceramida presentan ensamblajes sólidos muy rígidos, más rígidos que otros sistemas lipídicos de carácter sólido. En cuanto a la dinámica, las monocapas de ceramida durante la

compresión lateral también difieren significativamente de los sistemas fluidos (véase la figura 7.20A). El reblandecimiento dinámico observado para los monocapas ricas en ceramidas, $E(\omega) \geq E_0$, indica que la rigidez instantánea es menor que en las condiciones de compresión cuasi-estática. Esto es un comportamiento pseudo-plástico típico de sólidos blandos que fluyen más a mayores velocidades de flujo. De manera similar a los plásticos de Bingham, que no pueden fluir a velocidades bajas, tales materiales sólidos de compresión resisten cada vez más a frecuencias bajas, pero cuando se deforman en mayor proporción superan el punto de fluencia y fluyen [143]. Para las monocapas de ceramidas se observó un reblandecimiento del esfuerzo en las tasas de compresión más rápidas con el incremento de la deformación (véase figura 7.19). Para las monocapas ricas en SM, sin embargo, el módulo dinámico se mantuvo esencialmente constante e independiente de la frecuencia de compresión, una característica mecánica típica de fluidos newtonianos.

Elasticidad de la cizalla. Las membranas sólidas presentan rigidez estructural y por lo tanto resisten a las deformaciones por cizallamiento, y se caracterizan por un módulo de cizalla finito. Tal comportamiento se observó para los monocapas que contienen eggCer (ver figura 7.22), y mientras mayor es el contenido relativo de ceramida más rígido el carácter sólido de la membrana (ver figura 7.22C y 7.22D). Particularmente, en el estado de empaquetamiento biológicamente relevante (π_{bil}), las monocapas de ceramida puras se caracterizan por un módulo de cizalla tan alto como $G' \approx 80\text{-}100$ mN/m, un valor de tres órdenes de magnitud mayor que los valores correspondientes a las monocapas de DPPC en estado de gel [48]. Aunque al aumentar el contenido de SM disminuye el carácter sólido de la monocapa, G' permaneció con un valor finito hasta un contenido relativamente alto de SM ($G' > 0$ para $x_{Cer} < 66\%$), lo que muestra la gran capacidad de la ceramida para condensar moléculas de SM e impartir orden sólido en las membranas basadas en SM. Por otro lado, las monocapas de SM pura se caracterizan por un módulo de cizallamiento cero, una evidencia inequívoca de su fluidez.

Viscosidad superficial

Las propiedades de flujo fueron notablemente diferentes para las monocapas de ceramida en comparación con los típicos sistemas fluidos. En el estado de presión superficial biológicamente relevante (Π_{bil}), las viscosidades superficiales de las monocapas sólidas de ceramida tenían valores tan altos como $\eta_E \approx \eta_s \approx 200$ mNs/m (a una frecuencia de referencia, $\omega \approx 0,1$ s⁻¹; figuras 7.20B y 7.22B, respectivamente). Estos valores fueron comparativamente más altos que las viscosidades moderadas medidas para el DPPC en estado gel ($\eta_E \approx 100$ mNs/m [131] y $\eta_s \approx 1$ mNs/m [48]) y las relativamente bajas medidas en monocapas de lípidos fluidos ($\eta_E \approx 50$ mNs/m [144], $\eta_s \approx 0,3$ mNs/m [48] para POPC y $\eta_E \approx 20$ mNs/m [130], $\eta_s \ll 0,1$ mNs/m [48] para lípidos de E.coli ; a $\omega \approx 0,1$ s⁻¹. Las monocapas de SM mostraron de hecho una alta fluidez, caracterizada por viscosidades superficiales tan bajas como $\eta_E \approx 30$ mNs/m (Figura 7.20B) y $\eta_s \approx 0,1$ mNs/m (Figura 7.22B) ($\omega \approx 0,1$ s⁻¹). La mezcla de ceramida con SM provoca un aumento progresivo en la fluidez debido a la SM, que se produce en paralelo a la disminución del carácter sólido impuesto por la ceramida. La inversión entre el carácter predominantemente sólido y un comportamiento de carácter fluido se produjo cerca de la relación de composición Cer/SM 2:1. Mayores contenidos de SM fueron caracterizados por un carácter sólido relativamente bajo ($\ll 50\%$, tal como se define en la figura 7.22C) y una alta fluidez, típica de la SM. En la composición fisiológica 1:2 Cer/SM, el sistema se comportó esencialmente como un fluido ($G'' > G'$), aunque con una viscosidad de cizallamiento 2-3 veces mayor que la de SM pura y una muy baja, pero todavía finita, rigidez al esfuerzo de cizalla (véase figura 7.22). En consecuencia, se espera que las plataformas de ceramida existentes in vivo sean mucho más sólidas y viscosas que las típicas fases de membrana fluidas.

Movilidad lateral

Sobre la base de los resultados anteriores, los entornos de las membrana ricas en ceramida deben comportarse mecánicamente como sólidos débilmente rígidos (materia blanda) y exhibir menos fluidez que los entornos fluidos en la membrana fluida formados por esfingomielina, fosfolípidos, y sus mezclas con colesterol. Esta

hipótesis ha sido indicada previamente en la literatura [48, 145], pero los resultados presentes confirmar el escenario. Por lo tanto, si la producción enzimática de ceramida se activa en un sitio dado de la membrana, se espera una disminución en la fluidez en ese punto, seguido de una solidificación parcial de la membrana. En consecuencia, la difusión de las proteínas sería extremadamente ralentizado dentro de estos dominios ricos en ceramida. En un intento de entender las relaciones constitutivas entre las propiedades mecánicas y de transporte, como la ceramida afecta las movilidades laterales, vamos a discutir la correlación entre las movilidades de difusión y el carácter sólido impuesto por la ceramida. Las conclusiones serán puestas posteriormente en un contexto biológico. En la Figura 8.6, correlacionamos la difusión lateral obtenidas a partir de los experimentos de “particle tracking” con una propiedad de transporte como es la viscosidad de cizalla.

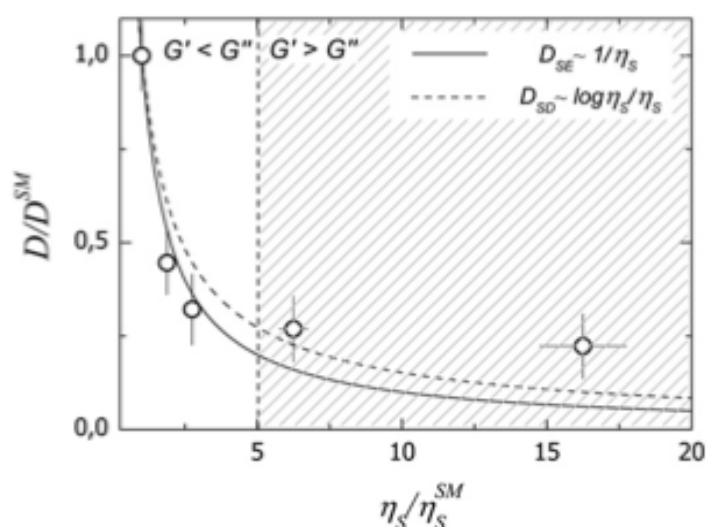


Figura 8.6. Coeficiente de difusión D relativo al coeficiente de difusión SM D^{SM} en función de la viscosidad superficial de cizalla η_s relativa a la viscosidad superficial de cizalla de SM η_s^{SM} obtenidos de los experimentos de cizalla oscilatoria para diferentes mezclas de eggCer/eggSM. La línea vertical discontinua separa los dos comportamientos viscoelásticos diferentes caracterizados por $G' < G''$ (izquierda) y $G' > G''$ (derecha). (Línea sólida) Dependencia de Stokes-Einstein. (Línea discontinua) Predicción de Saffmann-Delbrück

Como era de esperar, hubo una correlación inversa entre la difusión lateral y la viscosidad. En otras palabras, la fluidez de la membrana y la difusión lateral son proporcionales, $D \sim \eta_s^{-1}$, como se predice en la relación de Stokes- Einstein (SE) para el movimiento difusivo de un objeto esférico de radio R en un fluido bulk de viscosidad de cizalla η :

$$D_{SE} = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (\text{Ec. 8.2})$$

Esta expresión de SE se ha utilizado con éxito para determinar microviscosidades aparentes de movilidades experimentales. Sin embargo, el uso de la Ec. 8.2 para analizar la difusión de la membrana requiere convertir la viscosidad de bulk η en un valor equivalente de superficie. Esta correspondencia se realiza generalmente mediante la transformación de la viscosidad superficial de cizalla (η_s) de una membrana de espesor h en un valor de bulk equivalente utilizando la correspondencia dimensional aproximada, $\eta \sim h \eta_s$. Sin embargo, ninguna correspondencia cuantitativa exacta es proporcionada por esta relación, por lo tanto no se pueden calcular valores absolutos de viscosidad superficial utilizando la Ec. 8.2 a partir de experimentos de “particle tracking”. Sin embargo, la relación SE de superficie modificada puede ser utilizada con éxito para calcular viscosidades relativas a partir de difusiones relativas

$$\frac{D}{D^{(0)}} = \left(\frac{\eta_s}{\eta_s^{(0)}} \right)^{-1} \quad (\text{Ec 8.3})$$

La Ec. 8.3 se utilizó para probar la correlación inversa entre las difusiones laterales y las viscosidades de cizalla, medidas de forma independiente mediante particle tracking y mediante experimentos de reología, respectivamente. Para las monocapas fluidas ($x_{\text{Cer}} < 33\%$), la relación entre la teoría y los experimentos fue cuantitativa. Sin embargo, se encontraron movilidades más lentas mediante la Ec. 8.3 para los sistemas de carácter sólido ($x_{\text{Cer}} > 33\%$). Saffman y Delbrück mostraron que una partícula atrapada en una membrana

viscosa también siente fuerzas de arrastre de las fases bulk adyacentes, su movilidad aumenta por un factor logarítmico dependiendo de la relación de la superficie/viscosidad del bulk,

$$D_{SD} = \frac{k_B T}{6\pi\eta_{sh}} \log\left(\frac{\eta_{sh}}{2} - 0.577\right) \quad (\text{Ec. 8.4})$$

Las predicciones del modelo de Saffman y Delbrück se representan también en la Figura 8.6. Como era de esperar, la Ec. 8.4 predice movilidades más altas que las fuerzas de fricción SE efectivas en las Ecs. 8.2 y 8.37. A contenidos altos de SM ($x_{\text{Cer}} < 33\%$), las monocapas son tan fluidas que la corrección logarítmica no es muy relevante. Sin embargo, a viscosidades más altas, el modelo de Saffman y Delbrück predice movilidades superiores, aunque siguen siendo más lentas que las medidas experimentalmente en el tracking. Las movilidades laterales podrían ser consecuencia de un flujo viscoso en las membranas fluidas ricas en SM; sin embargo, el carácter viscoelástico introducido por la ceramida podría añadir una componente elástica adicional en el impulso de las partículas en $x_{\text{Cer}} > 33\%$. Como consecuencia, una elasticidad de membrana dominante en membranas ricas en ceramida podría dar una mayor movilidad de lo esperado desde el enfoque habitual de Saffman-Delbrück (ver Figura 8.6; $G' < G''$), que sólo toma en cuenta el control de fricción en un ambiente fluido ($G'' \gg G'$). En general, a pesar de estos detalles, los datos de la Figura 8.6 representan a la ceramida como un agente pastoso capaz de impartir cambios profundos en la dinámica de la membrana, en particular una gran disminución en las movilidades laterales de los objetos embebidos dentro de ella.

8.3. Implicaciones biológicas.

Las ceramidas se generan en la célula en respuesta a diferentes estreses que pueden dañar la célula o incluso activar una cascada de señalización que desencadene la muerte celular, la apoptosis. Recientemente, Cremesti et al. [146] han sugerido que los dominios ricos en ceramidas formados en la membrana plasmática durante la apoptosis juegan un papel importante en la inmovilización de objetos embebidos en la membrana, dando lugar a una acumulación de proteínas inmovilizadas que desencadenan los eventos de señalización previos a la apoptosis. Los resultados expuestos en esta tesis ayudan a comprender el origen de la capacidad de

inmovilización de los dominios de ceramida sólidos. Los dominios ricos en ceramidas serían los elementos secuestradores de las proteínas que intervienen en la señalización apoptótica. Se ha observado recientemente que, en general, algunas proteínas de membrana particionan preferentemente en dominios de ceramida [147], incluidas algunas proteínas involucradas en procesos de señalización. Debido al carácter sólido de las membranas ricas en ceramida, es de tener en cuenta que la movilidad de la proteína se reducirá en gran medida cuando se encuentre en un entorno rico en ceramida. La difusión de proteínas dentro de un dominio rico en ceramida sería extremadamente ralentizado y las proteínas de señalización quedarían congeladas (capping) dentro de los dominios. Este efecto podría producir una amplificación en la señalización. A temperaturas más altas, las membranas ricas en ceramidas podría fundirse en una fase de líquido condensado, que es esencialmente fluida ($G' \approx 0$), pero con una alta viscosidad. Además, el comportamiento de "softening" del esfuerzo en monocapas de ceramida podría ser relevante para el movimiento de proteínas, sobre todo durante el plegamiento: las ceramidas podrían proporcionar un entorno pastoso en reposo, protegiendo a las proteínas de la desnaturalización conformacional derivada de las fluctuaciones térmicas. Sin embargo, la plasticidad del entorno circundante de ceramidas podría permitir también los grandes cambios conformacionales que requieren las proteínas para realizar sus funciones. Todo esto nos hace conjeturar sobre el papel mecánico de las ceramidas en la fisiología de la membrana.

Este comportamiento viscoregulado podría estar regulado mediante fluctuaciones de temperatura. Y podría tener importantes efectos en procesos como los choques térmicos, en los que las ceramidas están involucradas. El mecanismo por el cual existe un rápido incremento de ceramida en los procesos de choques térmicos todavía se desconoce. Durante un sobrecalentamiento, la incorporación de ceramidas podría permitir a la célula controlar los cambios de viscosidad de las membranas celulares, manteniendo la rigidez y a integridad celulares. Durante un proceso de reenfriamiento a temperaturas fisiológicas, los procesos de subenfriamiento observados en monocapas de ceramidas podrían actuar como un sistema de seguridad para mantener las propiedades fluidas de las membranas.

En definitiva, las propiedades mecánicas de monocapas ricas en ceramidas a temperaturas fisiológicas pueden variar drásticamente en rangos de temperatura pequeños y dependen también de la composición local de la membrana, en particular con las mezclas que forme con su precursor molecular, la esfingomielina. Esta diversidad de comportamientos hace de la ceramida un lípido muy versátil capaz de procurar a las membranas de unas propiedades que se adaptan a las necesidades termodinámicas de los procesos biológicos en los que estén involucradas.

Parte IV
CONCLUSIÓN

9 CONCLUSIONES

Las monocapas de ceramida son sólidas y plásticas. Se han realizado experimentos reológicos en monocapas de Langmuir de ceramida de huevo, tanto en compresión como en cizallamiento. A una presión superficial lo suficientemente alta, las monocapas son sólidas, y se caracterizan por altos valores de módulos de compresión y de cizalla. Estos sólidos de dos dimensiones tienen un pequeño coeficiente de Poisson, típico de sólidos ($\nu < 1$), pero mas blandos que los cristales rígidos ($\nu = 0$). Las monocapas con estados de empaquetamiento altos, a altas deformaciones, se someten a deformaciones plásticas de una manera similar al deslizamiento de dislocaciones en los sólidos. Estos resultados ilustran el comportamiento mecánico de un sólido molecular en dos dimensiones. Dentro de nuestro conocimiento, estas medidas proporcionan la primera determinación directa de un coeficiente de Poisson en una película sólida de Langmuir, abriendo una nueva metodología para la caracterización estructural y mecánica de estos sistemas.

Las monocapas de ceramida tienen transiciones termomecánicas a temperaturas fisiológicas. Se realizaron experimentos reológicos de cizalla complementarios a diferentes temperaturas. Mediante la medida experimental de los parámetros mecánicos y un estudio de isothermas e isobaras se pudo asignar a cada fase su comportamiento mecánico. Así A muy bajas temperaturas ($< 20^{\circ}\text{C}$, fase S_0) las ceramidas se comportan como materiales sólidos capaces de soportar deformaciones de cizalla. Por encima de esta temperatura, las ceramidas se reblandecen mecánicamente aunque muestran todavía características sólidas ($G' > G'' > 0$, fase LC). A temperaturas fisiológicas (en torno a 40°C), las fases condensadas penetran en una fase LC+LE caracterizada por un módulo elástico de cizalla próximo a cero, pero soportan deformaciones de compresión, es decir las ceramidas de huevo se comportan como fluidos macroscópicos. A más altas temperaturas, las ceramidas de huevo sufren una transición a una fase LE, caracterizadas de nuevo por módulos de cizalla nulos.

Las ceramidas rigidifican las membranas compuestas por esfingomielina. Para estudiar las propiedades viscoelásticas de la ceramida de huevo y sus mezclas con esfingomielina, se realizaron medidas de reología superficial oscilatoria tanto de compresión como de cizalla en monocapas de Langmuir. Se midieron módulos de compresión y cizalla altas para la ceramida, compatibles con el estado sólido de la membrana, así como valores de viscosidad superficial

extremadamente altos comparados a los típicos valores de viscosidad de otros lípidos de membrana que son más fluidos. Para la esfingomielina se obtuvo un comportamiento reológico correspondiente al comportamiento de un fluido. La incorporación de ceramidas en monocapas de esfingomielina hace variar de manera dependiente con la concentración de ceramida los módulos elásticos de compresión y cizalla de SM; desde valores $E' = 100$ mN/m, $G' = 0$ mN/m, $G'' = 1$ mN/m a $E' = 400$ mN/m, $G' = 90$ mN/m y $G'' = 25$ mN/m. A bajas concentraciones de ceramida ($X_{cer} < 66\%$) la monocapa se comporta como un gel viscoso, a partir de ($X_{cer} > 66\%$) las monocapas se comportan como un sólido.

La movilidad de objetos embebidos en membranas de esfingomielina se ve reducida por la presencia de ceramida. Se realizaron experimentos de “particle tracking” en las monocapas de lípido, para medir las movilidades laterales y se observó que presentan una correlación con la viscosidad de las monocapas a través de las relaciones usuales de hidrodinámica. En conclusión, la ceramida incrementa el carácter sólido y disminuye la fluidez de las membranas compuestas de esfingomielina, disminuyendo así drásticamente la movilidad que tienen los objetos incrustados en la misma.

Tomando en su conjunto todas estas conclusiones, y en un contexto biológico, los resultados son plausiblemente relevantes a la conjetura previa sobre la función mecánica de la ceramida en el funcionamiento de la membrana durante procesos de señalización.

REFERENCIAS

- ¹ Tanford C. (1972). Hydrophobic free energy, micelle formation and the association of proteins with amphiphilies. *J. Mol. Biol.*, **67**: 59-74.
- ² Tanford, C. (1973). The hydrophobic effect: Formation of micelles in biological membranes. *John Wiley*. New York.
- ³ Luzzati, V., Tardieu, A. and Gulik-Krzywicki, T. (1968). Polymorphism of lipids. *Nature*, **217**: 1028-1030
- ⁴ Luzzati, V., Gulik-Krzywicki, T. and Tardieu, A. (1968). Polymorphism of lecithins. *Nature*, **218**: 1031-1034
- ⁵ Luzzati, V., Tardieu, A., Gulik-Krzywicki, T., Rivas, E., and Reoss-Huson, F. (1968). Structure of the cubic phases of lipid-water systems. *Nature*, **220**: 485-488
- ⁶ Cevc, G. (1993). Phospholipids Handbook. *Marcel Dekker, Inc.* New York.
- ⁷ Kornberg, R.D. and McConnell H.M. (1971). Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *PNAS USA.*, **68**: 2564-2568
- ⁸ Träuble, H. and E. Sackmann. (1972). Studies of the crystalline-liquid crystalline phase transition of lipid model membranes. 3. Structure of a steroid-lecithin system below and above the lipid-phase transition. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**: 4499-4510.
- ⁹ Devaux, P.F. and McConnell H.M. (1972). Lateral diffusion in spin-labeled phosphatidylcholine multilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**: 4475-4481
- ¹⁰ Scandella, C.J., Devaux, P.F. and McConnell H.M. (1972). Rapid lateral diffusion of phospholipids in rabbit sarcoplasmic reticulum. *PNAS USA*, **69**: 2056-2060.
- ¹¹ Lee, A.G., Birsall, N.J. and Metcalfe J.C. (1973). Measurement of fast lateral diffusion of lipids in vesicles and in biological membranes by ¹H nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*, **12**: 1650-1659
- ¹² Wu, E.S., Jacobson, K. and Papahadjopoulos, D. 1977. Lateral diffusion in phospholipid multibilayers measured by fluorescence recovery after photobleaching. *Biochemistry*, **16**: 3836-3841

-
- ¹³ Lange, A., Marsh, D., Wassmer, K.H., Meier, P. and Kothe, G. Electron spin resonance study of phospholipid membranes employing a comprehensive line-shape model. *Biochemistry*, **24**: 4383-4392
- ¹⁴ Mayer, C., Gröbner, G., Müller, K., Weisz, K. and Kothe, G. (1990). Orientation-dependent deuteron spin-lattice relaxation times in bilayer membranes: characterization of the overall lipid motion. *Chem. Phys. Lett.*, **165**: 155-161
- ¹⁵ Wittebort, R.J., Blume, A., Huang, T.H., Das Gupta, S.K., and Griffin, R.G. (1982). Carbon-13 nuclear magnetic resonance investigations of phase transitions and phase equilibria in pure and mixed phospholipid bilayers. *Biochemistry*, **21**: 3487-3502
- ¹⁶ Kornberg, R.D. and McConnell H.M. (1971). Inside-outside transitions of phospholipids in vesicle membranes. *Biochemistry*, **10**:1111-1120
- ¹⁷ Albert, A.D. and P.L. Yeagle. (1982). The extent of transmembrane phospholipid movement in mixed phosphatidylcholine-phosphatidylserine vesicles. *Membr Biochem.*, **4**:159-173
- ¹⁸ Bai, J. and Pagano, R.E. (1997). Measurement of spontaneous transfer and transbilayer movement of BODIPY-labeled lipids in lipid vesicles. *Biochemistry*., **36**: 8840-8848.
- ¹⁹ Fujii, T., Tamura, A. and T. Yamane. (1985). Trans-bilayer movement of added phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine species with various acyl chain lengths in plasma membrane of intact human erythrocytes. *J. Biochem.*, **98**: 1221-1227.
- ²⁰ Homan, R. and Pownall, H.J. (1988). Transbilayer diffusion of phospholipids: dependence on headgroup structure and acyl chain length. *Biochim Biophys Acta.*, **938**: 155-66
- ²¹ Wimley, W.C. and Thompson, T.E. (1990). Exchange and flip-flop of dimyristoylphosphatidylcholine in liquid-crystalline, gel, and two-component, two-phase large unilamellar vesicles. *Biochemistry*, **29**: 1296-1303.
- ²² Wimley, W.C. and Thompson, T.E. (1991). Transbilayer and interbilayer phospholipid exchange in dimyristoylphosphatidylcholine /

dimyristoylphosphatidylethanolamine large unilamellar vesicles. *Biochemistry*, 30: 1702-1709.

²³ I. Lopez-Montero, N. Rodriguez, S. Cribier, A. Pohl, M. Velez, P.F. Devaux, Rapid transbilayer movement of ceramides in phospholipid vesicles and in human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 25811-25819.

²⁴ Lasic, D.D. (1982). A molecular model for vesicle formation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **692**: 501-502

²⁵ [Fromherz, 1983] Fromherz, P. (1983). Lipid-vesicle structure: size control by edge-active agents. *Chem. Phys. Lett.*, **94**: 259-266

²⁶ Fromherz, P. and Rüppel, D. (1985). Lipid vesicle formation : the transition from open disks to closed shells. *FEBS Lett.*, **179**: 155-159

²⁷ Lasic, D.D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.*, **256**: 1-11

²⁸ Hauser, H. and N. Gains, Spontaneous vesiculation of phospholipids: a simple and quick method of forming unilamellar vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1982. **79**(6): p. 1683-1687.

²⁹ Woodle, M.C. and D. Papahadjopoulos, Liposome preparation and size characterization. *Methods Enzymol*, 1989. **171**: p. 193-217.

³⁰ Huang, C.-H., Phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. *Biochemistry*, 1969. **8**(1): p. 344-352.

³¹ Hamilton, R.L., et al., Unilamellar liposomes made with the French pressure cell: a simple preparative and semiquantitative technique. *Journal of Lipid Research*, 1980. **21**(8): p. 981-92.

³² Nozaki, Y., D. Lasic, and J. Tanford, Size analysis of phospholipid vesicle preparations. *Science*, 1982. **217**(4557): p. 366-367.

³³ Deamer, D. and A.D. Bangham, Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1976. **443**(3): p. 629-634.

³⁴ Szoka, F. and D. Papahadjopoulos, Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1978. **75**(9): p. 4194-4198.

-
- ³⁵ Angelova, M. I., S. Soleau, P. Meleard, J. F. Faucon, and Bothorel, P. (1992). Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, **89**:127-131.
- ³⁶ Arriaga LR, Datta SS, Kim SH, Amstad E, Kodger TE, Monroy F, Weitz DA. Ultrathin shell double emulsion templated giant unilamellar lipid vesicles with controlled microdomain formation. *Small*. 2014, 10:950-6.
- ³⁷ Evans, E and D. Needham. (1987). Physical properties of surfactant bilayer membranes: thermal transitions, elasticity, rigidity, cohesion and colloidal interactions. *J.Phys.Chem.*, **91**: 4219-4228.
- ³⁸ Needham, D. and R.M. Hochmuth. (1989). Electro-mechanical permeabilization of lipid vesicles. Role of membrane tension and compressibility. *Biophys. J.*, **55**: 1001-1009.
- ³⁹ Needham, D., T.J. McIntosh and E. Evans. (1988). Thermomechanical and transition properties of dimyristoylphosphatidylcholine/cholesterol bilayers. *Biochemistry*, **27**: 4668-4673
- ⁴⁰ McIntosh, T.J., A.D. Magid and S.A. Simon. (1989). Cholesterol modifies the short-range repulsive interactions between phosphatidylcholine membranes. *Biochemistry*, **28**: 17-25.
- ⁴¹ [McIntosh et al., 1992] McIntosh, T.J., S.A. Simon, D. Needham and C.H. Huang. (1992). Structure and cohesive properties of sphingomyelin:cholesterol bilayers. *Biochemistry*, **31**: 2012-2020.
- ⁴² Needham, D. and R. S. Nunn. (1990). Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol. *Biophys. J.*, **58**:997-1009.
- ⁴³ Bloom, M., E. Evans, and O. G. Mouritsen. (1991). Physical properties of the fluid lipid bilayer component of cell membranes. *Quart. Rev. Biophys.*, **24**: 293-397.
- ⁴⁴ Hallett, F. R., J. Marsh, B. G. Nickle and J. M. Wood. (1993). Mechanical properties of vesicles. II. A model for osmotic swelling and lysis. *Biophys. J.*, **64** 435-442.
- ⁴⁵ Mui, B. L.-S., P. R. Cullis, E. A. Evans and T. D. Madden. (1993). Osmotic properties of large unilamellar vesicles prepared by extrusion. *Biophys. J.*, **64**: 443-453.

-
- ⁴⁶ Olbrich, K.C., W. Rawicz, D. Needham and E. Evans. (2000). Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated phosphatidylcholine bilayers. *Biophys. J.*, **79**: 321-327
- ⁴⁷ Helfrich, W. and R.-M. Servuss. (1984). Undulations, steric interaction and cohesion of fluid membranes. *Il Nuovo Cimento*, **3**: 137-151.
- ⁴⁸ Espinosa, G., I. López-Montero, J., D. Langevin. 2011. Shear rheology of lipid monolayers and insights on membrane fluidity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:6008-6013.
- ⁴⁹ Servuss, R.M., Harbich, W. and W. Helfrich. (1976). Measurement of the curvature-elastic modulus of egg lecithin bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **436**: 900-903.
- ⁵⁰ Duwe, H.P., Käs, J. and E. Sackmann. (1990). Bending elastic moduli of lipid bilayers: modulation by solutes. *J. Phys. France*, **51**: 945-962.
- ⁵¹ Rawicz, W., K.C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham and E. Evans. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.*, **79**: 328-339.
- ⁵² Devaux, P.F. and M. Seigneuret. (1985). Specificity of lipid-protein interactions as determined by spectroscopic techniques. *Biochim. Biophys. Acta*, **822**: 63-125.
- ⁵³ Singer, S.J. and G.L. Nicolson. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**: 720-731
- ⁵⁴ Wieland, F.T., Gleason, M.L., Serafini, T.A. and J.E. Rothman. (1987). The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell*, **50**: 289-300.
- ⁵⁵ Karrenbauer, A., Jeckel, D., Just, W., Birk, R., Schmidt, R.R., Rothman, J.E. and F.T. Wieland. The rate of bulk flow from the Golgi to the plasma membrane. *Cell*, **63**: 259-267.
- ⁵⁶ Engstler, M., Thilo, L., Weise, F., Grunfelder, C.G., Schwarz, H., Boshart, M. and P. Overath. (2004). Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell. Sci.*, **117**: 1105-1115.

-
- ⁵⁷ Cullis, P.R. (1976). Lateral diffusion rates of phosphatidylcholine in vesicle membranes: effects of cholesterol and hydrocarbon phase transitions. *FEBS Lett.*, **70**: 223-228
- ⁵⁸ Fahey, P.F., Koppel, D.E., Barak, L.S., Wolf, D.E., Elson, E.L. and Webb, W.W. (1977). Lateral diffusion in planar lipid bilayers. *Science*, **195**: 305-306
- ⁵⁹ Rubenstein, J.L., Smith, B.A. and McConnell, H.M. (1979). Lateral diffusion in binary mixtures of cholesterol and phosphatidylcholines. *PNAS USA*, **76**:15-18.
- ⁶⁰ John, K., Schreiber, S., Kubelt, J., Herrmann, A. and P. Muller. (2002). Transbilayer movement of phospholipids at the main phase transition of lipid membranes: implications for rapid flip-flop in biological membranes. *Biophys. J.*, **83**: 3315-3323.
- ⁶¹ Vist, M. R., and J. H. Davis. (1990). Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: ²H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry. *Biochemistry*, **29**:451-464
- ⁶² Ipsen, J.H., Karlstrom, G., Mouritsen, O.G., Wennerstrom, H. and M.J. Zuckermann. (1987). Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta*, **905**:162-172.
- ⁶³ Sankaram, M.B. and Thompson, T.E. (1991). Cholesterol-induced fluid-phase immiscibility in membranes. *PNAS USA*, **88**: 8686-8690.
- ⁶⁴ Silvius, J.R. (1992). Cholesterol modulation of lipid intermixing in phospholipid and glycosphingolipid mixtures. Evaluation using fluorescent lipid probes and brominated lipid quenchers. *Biochemistry*, **31**: 3398-3408.
- ⁶⁵ Silvius, J.R., del Giudice, D. and Lafleur, M. (1996). Cholesterol at different bilayer concentrations can promote or antagonize lateral segregation of phospholipids of differing acyl chain length. *Biochemistry*, **35**: 15198-15208.
- ⁶⁶ Ahmed, S.N., Brown, D.A. and E. London. (1997). On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry*, **36**: 10944-10953

-
- ⁶⁷ Xu, X. and London, E. (2000). The effect of sterol structure on membrane lipid domains reveals how cholesterol can induce lipid domain formation. *Biochemistry*, **39**: 843-849.
- ⁶⁸ [Simons et van Meer, 1988] Simons, K. and G. van Meer. (1988). Lipid polarity and sorting in epithelial cells. *J. Cell. Biochem.*, **36**: 51-58.
- ⁶⁹ Simons, K. and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**: 569-572.
- ⁷⁰ Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, et al. A comprehensive classification system for lipids. *Eur J Lipid Sci Technol* 2005;107:337-64.
- ⁷¹ Sandhoff R. Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis. *FEBS Lett* 2010;584:1907-13.
- ⁷² Goni FM, Contreras FX, Montes LR, Sot J, Alonso A. Biophysics (and sociology) of ceramides. *Biochem Soc Symp* 2005:177-88.
- ⁷³ Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains-structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2009;1788:178-83.
- ⁷⁴ Stancevic B, Kolesnick R. Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Lett* 2010;584:1728-40.
- ⁷⁵ Ruvolo PP. Intracellular signal transduction pathways activated by ceramide and its metabolites. *Pharmacol Res* 2003;47:383-92.
- ⁷⁶ Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromol Med* 2010;12:320-30.
- ⁷⁷ Morad SA, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013;13:51-65.
- ⁷⁸ Carpinteiro A, Dumitru C, Schenck M, Gulbins E. Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer Lett* 2008;264:1-10.
- ⁷⁹ Bartke N, Hannun YA. Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *J Lipid Res* 2009;50(Suppl):S91-6.

-
- ⁸⁰ Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S, Futerman AH. When do lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* 2006;281:25001-5.
- ⁸¹ Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Kawano M. CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:644-53.
- ⁸² Yamaoka S, Miyaji M, Kitano T, Umehara H, Okazaki T. Expression cloning of a human cDNA restoring sphingomyelin synthesis and cell growth in sphingomyelin synthase-defective lymphoid cells. *J Biol Chem* 2004;279:18688-93.
- ⁸³ Gulbins E, Dreschers S, Wilker B, Grassme H. Ceramide, membrane rafts and infections. *J Mol Med (Berl)* 2004;82:357-63.
- ⁸⁴ Airola MV, Hannun YA. Sphingolipid metabolism and neutral sphingomyelinases. *Handb Exp Pharmacol* 2013:57-76.
- ⁸⁵ Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:139-50.
- ⁸⁶ Duan RD. Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications. *Biochim Biophys Acta* 2006;1761:281-91.
- ⁸⁷ van Blitterswijk WJ, van der Luit AH, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem J* 2003;369:199-211.
- ⁸⁸ Tchikov V, Bertsch U, Fritsch J, Edelmann B, Schutze S. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways. *Eur J Cell Biol* 2011;90:467-75.
- ⁸⁹ Cremesti A, Paris F, Grassme H, Holler N, Tschopp J, Fuks Z, et al. Ceramide enables fast to cap and kill. *J Biol Chem* 2001;276:23954-61.
- ⁹⁰ Grassme H, Jekle A, Riehle A, Schwarz H, Berger J, Sandhoff K, et al. CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2001;276:20589-96.

-
- ⁹¹ Grassme H, Jendrossek V, Bock J, Riehle A, Gulbins E. Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering. *J Immunol* 2002;168:298–307.
- ⁹² Paris F, Grassme H, Cremesti A, Zager J, Fong Y, Haimovitz-Friedman A, et al. Natural ceramide reverses Fas resistance of acid sphingomyelinase(–/–) hepatocytes. *J Biol Chem* 2001;276:8297–305.
- ⁹³ Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal* 2008;20:1010–8.
- ⁹⁴ Shah J, Atienza JM, Duclos Jr RI, Rawlings AV, Dong Z, Shipley GG. Structural and thermotropic properties of synthetic C16:0 (palmitoyl) ceramide: effect of hydration. *J Lipid Res* 1995;36:1936–44.
- ⁹⁵ Pinto SN, Silva LC, de Almeida RF, Prieto M. Membrane domain formation, interdigitation, and morphological alterations induced by the very long chain asymmetric C24:1 ceramide. *Biophys J* 2008;95:2867–79.
- ⁹⁶ Jimenez-Rojo N, Garcia-Arribas AB, Sot J, Alonso A, Goni FM. Lipid bilayers containing sphingomyelins and ceramides of varying N-acyl lengths: a glimpse into sphingolipid complexity. *Biochim Biophys Acta* 2013;1838:456–64.
- ⁹⁷ Carrer DC, Maggio B. Phase behavior and molecular interactions in mixtures of ceramide with dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Lipid Res* 1999;40:1978–89.
- ⁹⁸ Maggio B. Favorable and unfavorable lateral interactions of ceramide, neutral glycosphingolipids and gangliosides in mixed monolayers. *Chem Phys Lipids* 2004;132:209–24.
- ⁹⁹ Dupuy F, Fanani ML, Maggio B. Ceramide N-acyl chain length: a determinant of bidimensional transitions, condensed domain morphology, and interfacial thickness. *Langmuir* 2011;27:3783–91.
- ¹⁰⁰ Dupuy F, Maggio B. The hydrophobic mismatch determines the miscibility of ceramides in lipid monolayers. *Chem Phys Lipids* 2012;165:615–29.
- ¹⁰¹ Fanani ML, Maggio B. Liquid–liquid domain miscibility driven by composition and domain thickness mismatch in ternary lipid monolayers. *J Phys Chem B* 2011;115:41–9.

-
- ¹⁰² Sot J, Goñi FM, Alonso A. Molecular associations and surface-active properties of short- and long-N-acyl chain ceramides. *Biochim Biophys Acta* 2005;1711:12–9.
- ¹⁰³ Fanani ML1, Maggio B. Phase state and surface topography of palmitoyl-ceramide monolayers. *Chem Phys Lipids*. 2010 163:594–600.
- ¹⁰⁴ H. Grassme, A. Jekle, A. Riehle, H. Schwarz, J. Berger, K. Sandhoff, R. Kolesnick, E. Gulbins, CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 20589–20596.
- ¹⁰⁵ H. Grassme, V. Jendrosseck, J. Bock, A. Riehle, E. Gulbins, Ceramide-rich membrane rafts mediate CD40 clustering, *J. Immunol.* 168 (2002) 298–307.
- ¹⁰⁶ H. Grassme, V. Jendrosseck, A. Riehle, G. von Kurthy, J. Berger, H. Schwarz, M. Weller, R. Kolesnick, E. Gulbins, Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts, *Nat. Med.* 9 (2003) 322–330.
- ¹⁰⁷ Abraham, B. M.; Miyano, K.; Xu, S. Q. Centro-symmetric technique for measuring shear modulus, viscosity, and surface tension of spread monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* 1983, 54, 213.
- ¹⁰⁸ Levine, A.J. and T.C. Lubensky. 2001. Two-point microrheology and the electrostatic analogy, *Phys. Rev. E.* 65:011501, 1-13.
- ¹⁰⁹ Sickert, M. and F. Rondelez. 2003. Shear viscosity of Langmuir monolayers in the lowdensity limit. *Phys. Rev. Lett.* 90:126104
- ¹¹⁰ Busto, J. V.; Fanani, M. L.; De Tullio, L.; Sot, J.; Maggio, B.; Goñi, F. M.; Alonso, A. Coexistence of immiscible mixtures of palmitoylsphingomyelin and palmitoylceramide in monolayers and bilayers. *Biophys. J.* 2009, 97, 2717–26.
- ¹¹¹ Ybert, C.; Lu, W.; Möller, G.; Knobler, C. M. Collapse of a monolayer by three mechanisms. *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 2004–8.
- ¹¹² van Hunsel, J.; Joos, P. Stress relaxation experiments at the oil/water interface. *Colloids Surf.* 1987, 25, 251–261.
- ¹¹³ Marsh, D. Lateral pressure in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996, 1286, 183–223.

-
- ¹¹⁴ Landau, L. M.; Lifhsitz, E. M. *Theory of Elasticity*, 3rd ed.; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1986.
- ¹¹⁵ Hilles, H.; Monroy, F.; Bonales, L. J.; Ortega, F.; Rubio, R. G. Fourier-transform rheology of polymer Langmuir monolayers: Analysis of the non-linear and plastic behaviors. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2006, 122, 67–77.
- ¹¹⁶ Langevin, D.; Monroy, F. Interfacial rheology of polyelectrolytes and polymer monolayers at the air–water interface. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2010, 15, 283–93.
- ¹¹⁷ Abraham, B. M.; Miyano, K.; Xu, S. Q. Centro-symmetric technique for measuring shear modulus, viscosity, and surface tension of spread monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* 1983, 54, 213.
- ¹¹⁸ Vandebril, S.; Franck, A.; Fuller, G. G.; Moldenaers, P.; Vermant, J. A double wall-ring geometry for interfacial shear rheometry. *Rheol. Acta* 2010, 49, 131–44.
- ¹¹⁹ Sollich, P.; Le´queux, F.; He´braud, P.; Cates, M. E. Rheology of soft glassy materials. *Phys. Rev. Lett.* 1997, 78, 2020–3.
- ¹²⁰ L´opez-Montero, I.; Arriaga, L. R.; Monroy, F.; Rivas, G.; Tarazona, P.; V´elez, M. *Langmuir*. **2008**, 24, 4065–76.
- ¹²¹ L´opez-Montero, I.; Arriaga, L. R.; Rivas, G.; V´elez, M.; Monroy, F. *Chem. Phys. Lipids*. **2010**, 163, 56–63.
- ¹²² Chen, H.-C.; Mendelsohn, R.; Rerek, M. E.; Moore, D. J. *Biochim. Biophys. Acta*. **2000**, 1468, 293–303.
- ¹²³ Fanani, M. L., and B. Maggio. 2010. Phase state and surface topography of palmitoyl-ceramide monolayers. *Chem. Phys. Lipids*. 163:594–600.
- ¹²⁴ Stine, K. J., C. M. Knobler, and R. C. Desai. 1990. Buckling instability in monolayer network structures. *Phys. Rev. Lett.* 65:1004.
- ¹²⁵ Li, X. M., J. M. Smaby, ., R. E. Brown. 2000. Sphingomyelin interfacial behavior: the impact of changing acyl chain composition. *Biophys. J.* 78:1921–1931.
- ¹²⁶ Vaknin, D., M. S. Kelley, and B. M. Ocko. 2001. Sphingomyelin at the air-water interface. *J. Chem. Phys.* 115:7697–7704.

-
- ¹²⁷ Hilles, H., F. Monroy, J., R. G. Rubio. 2006. Fourier-transform rheology of polymer Langmuir monolayers: analysis of the non-linear and plastic behaviors. *Adv. Colloid Interface Sci.* 122:67–77.
- ¹²⁸ Knobler, C. M.; Desai, R. C. Phase transitions in monolayers. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 1992, 43, 207–236.
- ¹²⁹ Pascher, I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 455, 433–51.
- ¹³⁰ López-Montero, I.; Arriaga, L.R.; Monroy, F.; Rivas, G.; Tarazona, P.; Velez, M. High fluidity and soft elasticity of the inner membrane of *Escherichia coli* revealed by the surface rheology of model Langmuir monolayers. *Langmuir* 2008, 24, 4065–76.
- ¹³¹ Arriaga, L. R.; López-Montero, I.; Ignés-Mullol, J.; Monroy, F. H *Tj. Phys. Chem. B.* **2010**, TT, 114, 4509-20.
- ¹³² Hac-Wydro, K.; Dynarowicz-Łatka, P. The impact of sterol structure on the interactions with sphingomyelin in mixed langmuir monolayers. *J. Phys. Chem B.* 2008, T112, 11324–32.
- ¹³³ Maggio, B. Favorable and unfavorable lateral interactions of ceramide, neutral glycosphingolipids and gangliosides in mixed monolayers. *Chem. Phys. Lipids* 2004, 132, 209–24.
- ¹³⁴ Holopainen, J. M.; Brockman, H. L.; Brown, R. E.; Kinnunen, P. K. J. Interfacial interactions of ceramide with dimyristoylphosphatidylcholine: Impact of the N-acyl chain. *Biophys. J.* 2001, 80, 765–75.
- ¹³⁵ Sullan, R. M. A.; Li, J. K.; Zou, S. Direct correlation of structures and nanomechanical properties of multicomponent lipid bilayers. *Langmuir* 2009, 25, 7471–7.
- ¹³⁶ Kittel, C. *Introduction to Solid State Physics*, 8th ed.; Wiley: New York, 2004.
- ¹³⁷ Arriaga, L.R.; López-Montero, I.; Rodríguez-García, R.; Monroy, F. *Phys. Rev. E: Stat., Nonlinear, Soft Matter Phys.* 2008, 77, 061918.
- ¹³⁸ Petkov, J.; Gurkov, T.; Campbell, B.; Borwankar, R. Dilatational and shear elasticity of gel-like protein layers on air/water interface. *Langmuir* 2000, 16, 3703–11.

-
- ¹³⁹ Abraham, B. M.; Miyano, K.; Xu, S. Q. Centro-symmetric technique for measuring shear modulus, viscosity, and surface tension of spread monolayers. *Rev. Sci. Instrum.* 1983, 54, 213.
- ¹⁴⁰ Hilles, H.; Monroy, F. Dilational creep compliance in Langmuir polymer films. *Soft Matter* 2011, 7, 7790–6.
- ¹⁴¹ Sanford, R. J. *Principles of Fracture Mechanics*; Prentice Hall: Upper Saddle River, NJ, 2003.
- ¹⁴² Caruso B, Mangiarotti A, Wilke N. Stiffness of lipid monolayers with phase coexistence. *Langmuir*. 2013 29:10807-16.
- ¹⁴³ Bingham, E. C. 1922. *Fluidity and Plasticity*. McGraw-Hill, New York. 219.
- ¹⁴⁴ Isanta, S., G. Espinosa, ., F. Monroy. 2011. Active membranes with bound F-actin: sliding vs. sticking conditions. *Soft Matter*. 7:3100–3107.
- ¹⁴⁵ Wilke, N., and B. Maggio. 2009. The influence of domain crowding on the lateral diffusion of ceramide-enriched domains in a sphingomyelin monolayer. *J. Phys. Chem. B*. 113:12844–12851.
- ¹⁴⁶ Cremesti, A. E.; Goñi, F. M.; Kolesnick, R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* 2002, 531, 47–53.
- ¹⁴⁷ Chiantia, S.; Ries, J.; Chwastek, G.; Carrer, D.; Li, Z.; Bittman, R.; Schwille, P. Role of ceramide in membrane protein organization investigated by combined AFM and FCS. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* 2008, 1778, 1356–64.